

Aus der Klinik für Innere Medizin

Schwerpunkt Nephrologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. J. Hoyer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Expression und Modulation von TRP-Kanälen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Annette Klockner aus Heidelberg

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 31.10.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. J. Hoyer

1. Korreferent: Prof. Dr. Dr. J. Daut

2. Korreferent: Prof. Dr. T. D. Plant

INHALTSVERZEICHNIS

I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
III	TABELLENVERZEICHNIS	8
	Zusammenfassung/Summary.....	9
1	Einleitung.....	13
1.1.	Das Endothel.....	13
1.2.	Bedeutung von Calcium für die Funktion des Endothels.....	13
1.3.	TRP-Kanäle	16
1.3.1	Die Entdeckung der TRP-Kanäle in <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1.3.2	Humane TRP-Kanäle	16
1.3.3	Aufbau der TRP-Kanäle.....	17
1.3.4	Permeabilität und Steuerung von TRP-Kanälen.....	18
1.3.5	Die TRPC-Unterfamilie	19
1.3.6	Die TRPV-Unterfamilie	19
1.3.7	Die TRPM-Unterfamilie	20
1.3.8	Die TRPA-Unterfamilie	20
1.3.9	Die TRPML-Unterfamilie	21
1.3.10	Die TRPP-Unterfamilie.....	21
1.4.	TRP-Funktionen bei Endothelstimulation	22
1.5.	Vasoaktive Faktoren.....	23
1.6.	Der Einfluss pro-angiogenetischer Faktoren.....	25
1.7.	Endotheliale Dysfunktion und Hypertonie.....	27
1.8.	Fragestellung.....	29
2.	Material und Methoden.....	31
2.1.	Chemikalien und Geräte.....	31
2.1.1	Chemikalien	31
2.1.2	Geräte	32
2.2.	Zellkultur	32
2.2.1	Kultivierung der Endothelzellen	32
2.3.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	33
2.3.1	Extraktion der mRNA	33

Inhaltsverzeichnis

2.3.2	Umschreiben von mRNA in cDNA.....	33
2.3.3	Real-time PCR	34
2.3.4	Reduktion des Kontaminationsrisikos der RT-PCR.....	39
2.3.5	Auswertung der Real-time PCR	39
2.3.6	Linearitätsanalysen.....	40
2.3.7	Gelelektrophorese.....	41
2.4.	<i>Stimulationsuntersuchungen in vitro</i>	41
2.5.	<i>Statistische Analyse</i>	44
3.	<i>Ergebnisse</i>	45
3.1.	<i>Untersuchung der Expression von TRP-Kanälen in HMEC-1</i>	45
3.1.1	Expression der mRNA von hTRPC in HMEC-1	46
3.1.2	Expression der mRNA von hTRPV in HMEC-1	47
3.1.3	Expression der mRNA von hTRPM in HMEC-1	49
3.1.4	Expression der mRNA von hTRPA1, hTRPML, hTRPP1 und hPKD2like in HMEC-1	51
3.2.	<i>Linearitätsanalysen</i>	53
3.3.	<i>Veränderungen der mRNA-Expression von TRP-Kanälen in stimulierten HMEC-1</i>	57
3.3.1	Stimulation mit vasoaktiven Faktoren.....	57
3.3.2	Stimulation der HMEC-1 mit pro-angiogenetischen Faktoren.....	66
4.	<i>Diskussion</i>	76
4.1.	<i>Untersuchung der Expression von TRP-Kanälen in hMEC-1</i>	76
4.1.1	Vergleich mit den in der Literatur erhobenen Daten	76
4.1.2	Potentielle Gründe für die Diversität endothelialer TRP-Kanäle	77
4.1.3	Mögliche Bedeutung endothelialer TRP-Kanäle in HMEC-1	78
4.2.	<i>Veränderungen der mRNA-Expression von TRP-Kanälen in stimulierten HMEC-1</i>	81
4.3.	<i>Kritische Bewertung der Methodik</i>	82
4.4.	<i>Funktionelle Relevanz</i>	84
5.	<i>Literaturverzeichnis</i>	87
7.	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer</i>	97
8.	<i>Danksagung</i>	98
9.	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	99

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Arachidonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ADPR	Adenosindiphosphat-Ribose
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> ; basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
Ca ²⁺	Calciumion
[Ca ²⁺] _i	freie intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
CaM	Calmodulin
Ca _v	spannungsgesteuerter Ca ²⁺ -Kanal
DAG	Diacylglycerol
EC	<i>endothelial cell(s)</i> ; Endothelzelle(n)
EDHF	<i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i> ; Endothel-gebildeter hyperpolarisierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ET-1	Endothelin
ETA	Endothelin Rezeptor A
ETB	Endothelin Rezeptor B
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> ; G-Protein-gekoppelter Rezeptor
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor
K ⁺	Kaliumion
KO	<i>knock out</i> ; ein ausgeschaltetes Gen
LGC	<i>ligand-gated cation channel</i> ; durch Liganden-gesteuerter Kationenkanal
Mg ²⁺	Magnesiumion
[Mg ²⁺] _i	freie intrazelluläre Mg ²⁺ -Konzentration
Na ⁺	Natriumion
NO	Stickstoffmonoxid
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
PGI ₂	Prostazyklin
PIP ₂	Phosphatidyl-4,5-bisphosphat
PLA ₂	Phospholipase A ₂

Abkürzungsverzeichnis

PLC	Phospholipase C
RACs	<i>receptor-activated cation channel</i> ; Rezeptor-aktivierter Kationenkanal
rhEpo	rekombinantes, humanes Erythropoetin
ROCs	<i>receptor operated cation channel</i> ; Rezeptor-vermittelter Kationenkanal
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
SACs	<i>stretch-activated cation channels</i> ; durch Zug aktivierter Kationenkanal
SHR	<i>spontaneous hypertensive rat(s)</i> ; spontan hypertensive Ratte(n)
SOCs	<i>store-operated cation channel</i> ; Speicher-abhängiger Kationenkanal
TRP	<i>transient receptor potential</i> ; transientes Rezeptorpotential
TRPA	<i>transient receptor potential</i> , Typ Ankyrin
TRPC	<i>transient receptor potential</i> , Typ klassisch/kanonisch
TRPM	<i>transient receptor potential</i> , Typ Melastatin
TRPML	<i>transient receptor potential</i> , Typ Mukolipin
TRPV	<i>transient receptor potential</i> , Typ vanilloid
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> ; vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell(s)</i> ; glatte Gefäßmuskelzelle(n)
vWF	von-Willebrand-Faktor
WKY	Wistar Kyoto Ratte(n)
WT	<i>wild type</i> ; Wildtyp eines Gens

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1.: G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionskaskade	15
Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung der Architektur von Mitgliedern der TRP-Familie	17
Abbildung 1.3: Funktionelle Zusammensetzung der TRP-Monomere zu Tetrameren	18
Abbildung 1.4: Struktureller Aufbau der TRPC- und TRPV-Unterfamilie	20
Abbildung 1.5: Struktureller Aufbau der TRPM- und TRPA-Unterfamilie.....	21
Abbildung 1.6: Struktureller Aufbau der TRPML- und TRPP-Unterfamilie.....	21
Abbildung 1.7: Veränderung des Gefäßmuskeltonus durch vasoaktive Substanzen	24
Abbildung 1.8: Wirkungen von VEGF und Erythropoetin auf die Endothelzelle	26
Abbildung 2.1: Das Prinzip der quantitativen real time RT-PCR (TaqMan®-PCR)	35
Abbildung 2.2: Die Strukturformel von Bradykinin	42
Abbildung 2.3: Die Strukturformel von Histamin.....	42
Abbildung 2.4: Die Strukturformel von Endothelin-1.....	43
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Struktur von humanem VEGF	43
Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau von Erythropoetin	44
Abbildung 3.1a: Expressionshöhe der mRNA von hGAPDH, hvWF und hTRPC in HMEC-1	46
Abbildung 3.1b: Agarose-Gelelektrophorese von hGAPDH und hTRPC in HMEC-1	47
Abbildung 3.2a: Expressionshöhe der mRNA von hTRPV in HMEC-1	48
Abbildung 3.2b: Agarose-Gelelektrophorese von hTRPV in HMEC-1	49
Abbildung 3.3a: Expressionshöhe der mRNA von hTRPM in HMEC-1.....	50
Abbildung 3.3b: Agarose-Gelelektrophorese von hTRPM in HMEC-1	51
Abbildung 3.4a: Expressionshöhe der mRNA von hTRPML, hTRPA und hTRPP in HMEC-1.....	52
Abbildung 3.4b: Agarose-Gelelektrophorese von hTRPML, hTRPA und hTRPP in HMEC-1	53
Abbildung 3.5: Linearitätsanalyse von GAPDH, β -Aktin, vWF und TRP-Kanälen in HMEC-1	56
Abbildung 3.6a: vWF, TRPC1/3/4/6/7 nach Stimulation mit Bradykinin	58
Abbildung 3.6b: TRPM4/5/6/7/8, TRPML2 nach Stimulation mit Bradykinin.....	59
Abbildung 3.6c: TRPV1/2/4, TRPA1, TRPP1, PKD2like1 nach Stimulation mit Bradykinin.....	60
Abbildung 3.7a: vWF, TRPC1/3/4/6/7 nach Stimulation mit Histamin.....	61
Abbildung 3.7b: TRPM4/5/6/7/8, TRPML2 nach Stimulation mit Histamin	62
Abbildung 3.7c: TRPV1/2/4, TRPA1, TRPP1, PKD2like1 nach Stimulation mit Histamin.....	63
Abbildung 3.8a: vWF, TRPC1/3/4/6/7 nach Stimulation mit Endothelin.....	64
Abbildung 3.8b: TRPM4/5/6/7/8, TRPML2 nach Stimulation mit Endothelin	65

Abkürzungsverzeichnis

Abbildung 3.8c: TRPV1/2/4, TRPA1, TRPP1, PKD2like1 nach Stimulation mit Endothelin.....	66
Abbildung 3.9a: vWF, TRPC1/3/4/6/7 nach Stimulation mit VEGF	68
Abbildung 3.9b: TRPM4/5/6/7/8, TRPML2 nach Stimulation mit VEGF	69
Abbildung 3.9c: TRPV1/2/4, TRPA1, TRPP1, PKD2like1 nach Stimulation VEGF.....	70
Abbildung 3.10a: vWF, TRPC1/3/4/6/7 nach Stimulation mit EPO.....	71
Abbildung 3.10b: TRPM4/5/6/7/8, TRPML2 nach Stimulation mit EPO	72
Abbildung 3.10c: TRPV1/2/4, TRPA1, TRPP1, PKD2like1 nach Stimulation mit EPO.....	73

III TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 2.:</i>	<i>Primersequenzen der verwendeten humanen Primer.....</i>	<i>36</i>
Tab. 2.1	Humane Primersequenzen von GAPDH, β -Actin und vWF	36
Tab. 2.2	Humane Primersequenzen der TRPC-Unterfamilie	37
Tab. 2.3	Humane Primersequenzen der TRPV-Unterfamilie	37
Tab. 2.4	Humane Primersequenzen der TRPM-Unterfamilie	38
Tab. 2.5	Humane Primersequenzen der verbliebenen TRP-Kanäle	38
<i>Tabelle 3.1.:</i>	<i>Regression und Steigung der hTRP-Kanäle.....</i>	<i>54</i>
Tab. 3.1.1	Regression und Steigung von hGAPDH, h β -Actin, hvWF und hTRPC	54
Tab. 3.1.2	Regression und Steigung von hTRPV	54
Tab. 3.1.3	Regression und Steigung von hTRPM	55
Tab. 3.1.4	Regression und Steigung von hTRPA, hTRPML und hTRPP	55
<i>Tabelle 3.2.:</i>	<i>$\Delta\Delta$Ct-Werte der hTRP-Kanäle nach Stimulation</i>	<i>74</i>
Tab. 3.2.1	$\Delta\Delta$ Ct-Werte von hvWF, hTRPC-Kanäle.....	74
Tab. 3.2.2	$\Delta\Delta$ Ct-Werte von hTRPV-Kanäle	74
Tab. 3.2.3	$\Delta\Delta$ Ct-Werte von hTRPM-Kanäle.....	74
Tab. 3.2.4	$\Delta\Delta$ Ct-Werte von der restlichen hTRP-Kanäle.....	75

Zusammenfassung

Die Bedeutung des vaskulären Endothels für die Regulation der kardiovaskulären Homeostase ist, aufgrund einer zunehmenden Zahl an Daten, offensichtlich geworden. Die endotheliale Aktivierung und Dysfunktion spielt eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen. Um ihre Aufgaben erfüllen zu können, exprimieren Endothelzellen eine Vielzahl von membranständigen Ionenkanälen. Besondere Bedeutung weist dabei die Kontrolle des Ca^{2+} -Einstroms und die Modulation des Membranpotentials der Endothelzelle auf. Die Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgt sowohl über die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Intrazellulärraum als auch durch den Ca^{2+} -Einstrom von außerhalb der Zelle. Der extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom wird unter anderem über nicht-selektive Kationenkanäle vermittelt. Zu diesen gehören die 28 humanen Mitglieder der TRP-Familie. Die Bedeutung der TRP-Kanäle in humanen Endothelzellen ist bislang nicht abschließend geklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war die systematische Untersuchung der Expression aller humanen TRP-Kanäle in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) mittels der etablierten Methode der *Real-Time* RT-PCR. Als *house-keeping-Gen* diente GAPDH, als endothelialer Marker vWF, deren Expression ebenfalls untersucht wurden. Zur Verifizierung der durch RT-PCR gewonnenen Daten erfolgte von jeder durchgeführten RT-PCR eine Gelelektrophorese. Zusätzlich wurde die Qualität jedes Primers mittels Linearitätsanalysen validiert. Hierbei konnte die Expression der mRNA von TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6 und TRPC7, TRPV1, TRPV2 sowie TRPV4, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7 und TRPM8, TRPA1, TRPM2, TRPP1 und PKD2like1 gezeigt werden. Von diesen TRP-Kanälen war eine besonders hohe Expression von TRPC1, TRPC4, TRPC6, TRPM6, TRPM7, TRPM8 sowie TRPP1 nachweisbar.

Da wenig bekannt ist über die Aktivierung und Modulation von TRP-Kanälen in Endothelzellen, wurde anschließend mittels RT-PCR untersucht, ob die Stimulation der HMEC-1 mit verschiedenen vasoaktiven (Bradykinin, Histamin, Endothelin-1) und pro-angiogenetischen Faktoren (VEGF, Erythropoetin) zu einer Modulation der Expression der 28 humanen TRP-Kanäle in HMEC-1 führt. Auch hier wurden mittels Gelelektrophorese die gewonnenen Daten der RT-PCR bestätigt. Hierbei konnte nach Stimulation mit VEGF eine signifikant erhöhte Expression von TRPM8 aufgezeigt werden, ebenso war nach Stimulation mit Bradykinin eine signifikant erhöhte Expression von TRPM4, TRPM5 und TRPM8 aufzuweisen.

Insgesamt konnte anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt werden, dass humane mikrovaskuläre Endothelzellen von Typ HMEC-1 spezifische TRP-Kanäle exprimieren. Des Weiteren

konnte gezeigt werden, dass die Expression einiger dieser Kanäle nach endothelialer Stimulation erhöht wird. Somit konnte anhand der Stimulationsversuche gezeigt werden, dass vasoaktive und pro-angiogenetische Faktoren die Expression der TRP-Kanäle im Endothel modulieren können. Entgegen der Erwartungen war keine jedoch keine deutlich intensivere Expression einzelner TRP-Kanäle, trotz statischer Signifikanz nach Stimulation der HMEC-1, zu beobachten.

Das bessere Verständnis der physiologischen Funktion des Endothels und des vaskulären Systems liefert den Schlüssel zum Verständnis pathophysiologischer Prozesse und eröffnet neue therapeutische Perspektiven. So ist es vorstellbar, dass in Zukunft TRP-Kanäle aufgrund ihrer komplexen Funktionen im kardiovaskulären System an Bedeutung für die Entwicklung neuer Pharmaka gewinnen.

Summary

The importance of the vascular endothelium in the regulation of cardiovascular homeostasis has become more and more apparent because of an increasing quantity of data. The endothelial activation and dysfunction plays an important role in the pathogenesis of numerous cardiovascular diseases. To fulfill their diverse functions endothelial cells express a multitude of membrane ion channels. The control of the calcium influx and the modulation of the membrane potential of the endothelial cell are therefore of particular importance. The alteration of the intracellular calcium concentration results from release of calcium from the intracellular space as well as via calcium influx from extracellular. The extracellular calcium influx is thereby, among others, mediated by non-selective cation channels. These include the 28 human members of the TRP family. The importance of TRP channels in human endothelial cells is not yet completely understood.

The aim of the present study was to examine systematically the expression of all human TRP channels in human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) using the Real-Time RT-PCR, a well-established method. GAPDH was used as a house-keeping gene, the expression of the endothelial marker vWF was likewise studied. To verify the results of every carried out RT-PCR, a gel electrophoresis was performed for every RT-PCR. In addition the quality of every primer was validated by applying linearity analyzes. The expression of the mRNA of TRPC1, TRPC4, TRPC6, TRPC7, TRPV1, TRPV2 and TRPV4, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7, TRPM8 as well as TRPA1, TRPML2, TRPP1 and PKD2like1 could be demonstrated. The notably high expression of TRPC1, TRPC4, TRPC6, TRPM6, TRPM7, TRPM8 and TRPP1 was noteworthy.

Little is known about activation and modulation of TRP channels in human endothelial cells. Therefore, using RT-PCR, HMEC-1 were subsequently stimulated with different vasoactive (bradykinin, histamine, endothelin-1) and proangiogenic factors (VEGF, erythropoietin) to investigate whether these modulate the expression of TRP channels in HMEC-1. A gel-electrophoresis confirmed the results of the RT-PCR. A significant higher expression of TRPM8 after stimulation of HMEC-1 with VEGF as well as a significant higher expression of TRPM4, TRPM5 and TRPM8 after stimulation with bradykinin was able to be demonstrated.

In conclusion the results of this underlying study confirm that the human microvascular endothelial cells HMEC-1 express specific TRP channels. In addition it was able to be shown that some of the TRP channels (TRPM4, TRPM5, TRPM8) have a significantly higher expression after endothelial stimulation. Hence, on the basis of endothelial stimulation it was demonstrated that vasoactive and

proangiogenic factors can modulate the expression of TRP channels in the endothelium. In contrast to all expectations an extraordinary expression of certain TRP channels after stimulating despite statistical significance HMEC-1 with diverse substances was not shown.

The deeper understanding of the physiological function of the endothelium and of the vascular system in general provides the key to understanding pathophysiological processes and discloses new therapeutically perspectives. In the future, because of their complex functions in the cardiovascular system, TRP channels may gain importance for medical drug development.

1. Einleitung

1.1 Das Endothel

Das Endothel ist eine hoch spezialisierte einlagige Schicht aus flachen, polygonalen Zellen, welche das gesamte kardiovaskuläre System des Körpers auskleidet. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass das Endothel lediglich den Intravasalraum von tieferen Geweben trennt. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass Endothelzellen eine multifunktionelle, signaltransduzierende Oberfläche im vaskulären System bilden. Diese üben verschiedene Aufgaben abhängig von ihrer Lokalisation aus. Dazu gehören der selektive Stoffaustausch, immunologische und inflammatorische Prozesse, die Regulierung einer adäquaten Blutgerinnung sowie die Angiogenese. Eine weitere wichtige Funktion des Endothels ist der Einfluss auf den Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur und damit auf den Widerstand im Gefäßsystem (Michiel 2003). Zusätzlich reagiert das Endothel auf eine Vielzahl gefäßtonusmodulierender Reize, wie beispielsweise die hämodynamischen Kräfte des Blutflusses und zirkulierende humorale Faktoren (Acetylcholin, ATP, Bradykinin) oder die parakrine Freisetzung löslicher Mediatoren (u.a. Endothelin-1, Wachstumsfaktoren oder NO). Durch alle diese Funktionen trägt das Endothel zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutflusses bei (Nilius und Droogmans 2001) und spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen.

Die entscheidende Bedeutung des Endothels bei der Kontrolle des Gefäßtonus konnte erstmalig bei der durch Acetylcholin vermittelten Relaxation isolierter Aorten gezeigt werden (Furchgott und Zawadzki 1980). Der dafür verantwortlich Faktor wurde als NO identifiziert (Ignarro et al. 1987). Neben NO gehören zu den wichtigsten vasodilatatorischen Faktoren auch Prostazyklin (PGI_2) und EDHF (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*). Bei EDHF geht man davon aus, dass es sich dabei um ein System aus chemischen und elektrischen Prozessen handelt (Urakami-Harasawa et al. 1997), (Jaggar et al. 1998), (Feletou und Vanhoutte 2006). Als klassisches Beispiel einer vasokonstriktorisches Substanz gilt Endothelin-1.

1.2 Die Bedeutung von Calcium für die Funktion des Endothels

Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in vaskulären Endothelzellen wirkt als second messenger, der zahlreiche zelluläre Prozesse reguliert (Nilius und Droogmans 2001) (Nilius et al. 2007), so auch die Synthese aller drei Vasodilatoren. Der Ca^{2+} -Einstrom kann die Aktivität der konstitutiven

Einleitung

NO-Synthase, die die Produktion von NO katalysiert, stimulieren (Luckhoff et al. 1988). Auch die Aktivierung der PLA₂, das Schlüsselenzym der Produktion von Prostazyklin und EDHF, kann durch den Ca²⁺-Influx aktiviert werden. Die Vielfalt der durch Ca²⁺ vermittelten Effekte wird durch Amplitude sowie durch räumliches und zeitliches Verteilungsmuster von Ca²⁺ generiert. Dabei agiert das Ca²⁺-Signalsystem auf unterschiedliche Weise, um zelluläre Prozessen dynamisch zu regulieren. Der zugrunde liegende Mechanismus für das Ca²⁺-Signal erfolgt durch Veränderungen der freien intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i).

Zu den wichtigen Funktionen endothelialer Ionenkanäle gehört die Kontrolle des Ca²⁺-Einstroms und die Modulation des Membranpotentials. Das endotheliale Membranpotential stellt, zusammen mit dem transmembranösen Ca²⁺-Konzentrationsgradienten, die treibende Kraft für den Ca²⁺-Influx (Vennekens et al. 2003). Der Ca²⁺-Einstrom kann die [Ca²⁺]_i in der Zelle allgemein oder innerhalb definierter subzellulärer Kompartimente und Regionen erhöhen. Die Erhöhung der [Ca²⁺]_i erfolgt entweder über Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder aus dem Extrazellularraum, häufig jedoch über beide Wege. Das fundamentale System, das Veränderungen der [Ca²⁺]_i koordiniert, ist die Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese erfolgt entweder G-Protein gekoppelt und Rezeptor-Tyrosinkinase gekoppelt. Einige Mediatoren, wie Scherkräfte oder oxidativer Stress, können die Signalkaskade ohne Umweg über die Rezeptorbindung durch direkte Aktivierung von Phospholipasen aktivieren. Nach Stimulation der Endothelzelle kommt es durch Bindung von Agonisten an deren G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) zu einer Erhöhung der [Ca²⁺]_i innerhalb von Sekunden. Verantwortlich dafür sind die GPCRs, deren G_{qα}-Untereinheit die PLC aktiviert, von denen die PLC-β- und PLC-γ-Isoformen in Endothelzellen vorkommen. Die PLC generiert aus PIP₂ wiederum Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (InsP₃). Bindet InsP₃ an den InsP₃-Rezeptor in der Membran des ER, wirkt dieser als Kanal, der Ca²⁺ in das Zytosol freisetzt. Dadurch kommt es durch Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher zunächst zu einer transienten Erhöhung der [Ca²⁺]_i. Anschließend erfolgt eine zweite, nachhaltige Plateauphase aufgrund eines extrazellulären Ca²⁺-Einstroms mittels in der Plasmamembran lokalisierter Ca²⁺-permeabler Kationenkanäle (Tiruppathi et al. 2003). Die zum Ca²⁺-Einstrom führenden Ca²⁺-Kanäle können aufgrund ihres Aktivierungsmechanismus unterteilt werden. So gibt es den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) im Rückwärts-Modus, mittels Liganden aktivierbare Kanäle (LGC = *ligand-gated cation channels*), Rezeptor-aktivierte Kanäle (RACs = *receptor-activated cation channels*), wozu auch ROCs (*receptor-operated cation channels*) und SOC (*store-operated cation channels*) gehören, sowie durch Dehnung aktivierbare Kanäle (SACs = *stretch-activated cation channels*). Die molekulare Identität der drei letzten zelluläre Eintrittswege für Ca²⁺ ist noch nicht vollständig geklärt, wobei der SOC der am häufigsten in nicht erregbaren Zellen beobachtete Mechanismus des regulierten Ca²⁺-Einstroms ist, so erfolgt der Ca²⁺-Einstrom auch in vaskulären Endothelzellen insbesondere über SOC. Der SOC wird in

Einleitung

Abhängigkeit der Entleerung der internen ER-Speicher für Ca^{2+} aktiviert. In Abbildung 1.1 ist die mittels Agonisten induzierte Signaltransduktion dargestellt.

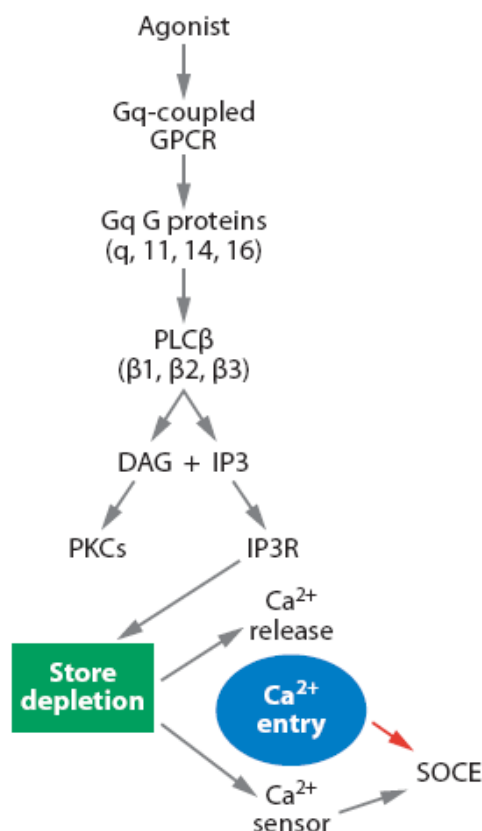


Abb. 1.1: G-Protein gekoppelte Signaltransduktionskaskade. Durch Binden eines Agonisten an einen Gq-gekoppelten GPCR werden Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vermittelt. Diese, durch Rezeptoren getriggerte Aktivierung der PLC mit nachfolgender Bildung von DAG und IP_3 , generiert die langsamen Ca^{2+} -Signale. Ähnliches erfolgt auch bei der Aktivierung über Rezeptor-Tyrosinkinasen, deren Signal jedoch über $\text{PLC}\gamma$ vermittelt wird [Birnbauer et al. 2009].

Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimuliert schließlich die Endothelzelle, verschiedene vasoaktive Substanzen, wie NO, EDHF, Prostaglandine und Endotheline, zu generieren. Abhängig von der Substanz und den vorhandenen Bedingungen kommt es zu Veränderungen des Gefäßtonus, der vaskulären Permeabilität, der Koagulation und des endothelialen Wachstums (Berridge et al. 2003) (Yao und Garland 2005) (Watanabe et al. 2008).

Der Prozess der intrazellulären Ca^{2+} -Regulation in vaskulären Endothelzellen beinhaltet regulierte Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und weiterer zellulärer Kompartimente durch Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms über Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle aus dem extrazellulären Raum, wie beispielsweise ROC oder SOC. Die funktionelle Charakterisierung und molekularbiologische Klassifizierung dieser Ca^{2+} -permeablen Kanäle ist noch nicht vollständig geklärt. Als Kandidaten hierfür gelten Kanäle der TRP-Genfamilie (TRP = *transient receptor potential*) (Nilius und Droogmans 2001), insbesondere die TRPC-Kanäle.

1.3 TRP-Kanäle

Die Superfamilie der TRP-Kanäle besteht aus einer großen Anzahl von Kationenkanälen. Diese sind meistens sowohl für monovalente Kationen, wie Na^+ und K^+ , als auch für divalente Kationen, wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , permeabel (Ramsey et al. 2006). Die meisten TRP-Untereinheiten haben nur eine geringe Spannungsselektivität, wodurch sie unempfindlich gegenüber Veränderungen des Membranpotentials sind (Nilius et al. 2005). Beim Öffnen depolarisieren die TRP-Kanäle die Zellen von ihrem Ruhemembranpotential aus auf etwa 0 mV. Dabei erhöhen sie die intrazelluläre Na^+ - und üblicherweise auch die Ca^{2+} -Konzentration (Clapham et al. 2005). Allgemein werden TRP-Kanäle fast ubiquitär exprimiert, so dass die meisten Zellen mehrere TRP-Kanäle besitzen (Pedersen et al. 2005).

1.3.1 Die Entdeckung der TRP-Kanäle in *Drosophila melanogaster*

Die Photoreaktion im Auge von *Drosophila melanogaster* beinhaltet die PLC-vermittelte Aktivierung von Membrankanälen, die zu einem depolarisierenden Rezeptorpotential führt (Hardie und Raghu 2001). Um die Bestandteile der Kaskade, die zum Licht-induzierten Strom (LIC) in *Drosophila* führen, zu untersuchen, wurden viele *Drosophila* Mutanten generiert und Veränderungen ihres LIC untersucht. Der von Cosens und Manning 1969 aufgrund von Verhaltensstudien identifizierte Strom wies ein transientes Rezeptorpotential auf (Cosens und Manning 1969). Obwohl die Zellen depolarisiert waren, zeigte sich eine beschleunigte Erholung zum Grundniveau. Aus diesem Grund und da der Ca^{2+} -Einstrom in diesen Mutanten deutlich vermindert war, wurde dieser Vorgang als „transientes Rezeptorpotential“ (*trp*) bezeichnet. Erst 1989 wurde der *trp*-Lokus von *Drosophila* auf molekularer Ebene charakterisiert. *Trp* war damit das erste Mitglied einer neuen Familie von integralen Ca^{2+} -Kanälen (Montell und Rubin 1989).

Obwohl zunächst angenommen wurde, dass *trp* ein spezifisches Protein von *Drosophila melanogaster* sei, konnte mittels PCR-Klonieren das Vorkommen von Homologen des *Drosophila trp*-Proteins auch in anderen Arten gezeigt werden (Petersen et al. 1995), (Vennekens et al. 2002).

1.3.2 Humane TRP-Kanäle

Humane Zellen exprimieren 27 TRP-Kanäle, welche aufgrund der Homologie ihrer Aminosäuresequenz in sechs Unterfamilien unterteilt werden können: die TRPC (kanonisch/klassisch), die TRPV (vanilloid), die TRPM (Melastatin), die TRPP (Polyzystin), die TRPML (Mukolipin) und die TRPA (Ankyrin) (Montell et al. 2002) (Montell et al. 2002) (Pedersen et al. 2005) (Nilius et al. 2007). Von den Unterfamilien weisen TRPC, TRPV, TRPM und TRPA eine größere strukturelle Ähnlichkeit auf. Eine weitere Unterfamilie ist die TRPN-Gruppe (NOMP, *No mechanopotential*). Die derzeitigen Informationen des Genoms lassen darauf schließen, dass es keine TRPN-Orthologe in Säugern gibt.

1.3.3. Aufbau der TRP-Kanäle

Jeder TRP-Kanal-Untereinheit besteht aus 6 Transmembrandomänen (S1-S6) mit einer Porenbildenden Region, dem *Pore Loop*. Der *Pore Loop* stellt einen Selektivitätsfilter zwischen S5 und S6 dar (Vannier et al. 1998), (Montell et al. 2002). Zusätzlich gibt es noch einen intrazellulär lokalisierten C- und N-Terminus. Die fehlende positive Ladung von S4 führt zur geringen Spannungsselektivität der TRP-Kanäle. Die Struktur der Pore bestimmt Selektivität und Permeabilität eines gegebenen Kanals wesentlich mit (Abbildung 1.2).

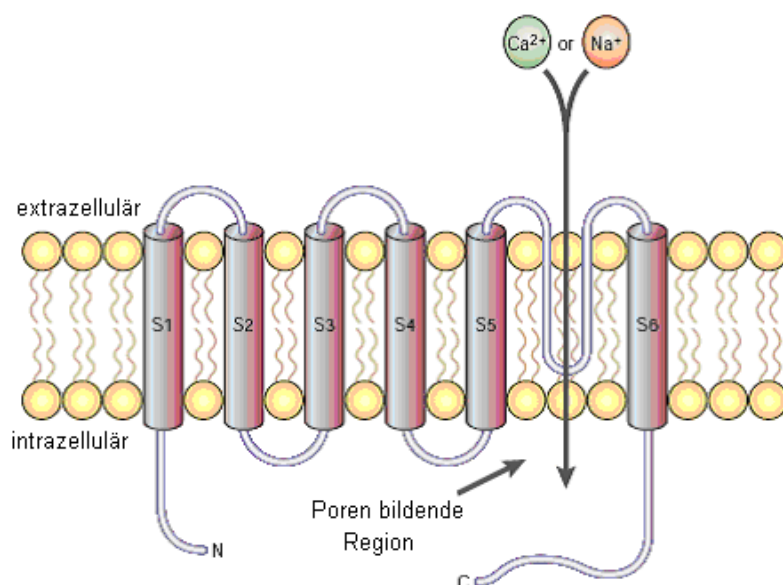


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Architektur von Mitgliedern der TRP-Familie. Alle TRP-Kanäle weisen drei allgemeine Komponenten auf: eine zentrale Domäne, bestehend aus den sechs Transmembrandomänen S1-S6, sowie den zytosolischen N- und C-Terminus. Beide Termini enthalten eine variable Zahl an Protein-Protein-Interaktionsmotiven, welche die einzelnen Kanäle charakterisieren. Die Länge des N- und C-terminalen Restes variiert signifikant innerhalb der Mitglieder der TRP-Familie [modifiziert nach (Clapham et al. 2001)].

Der N-Terminus von TRPV, TRPC und TRPA enthält multiple Ankyrin-bindende Wiederholungen. Diese Sequenzmotive aus 33 Aminosäureresten scheinen primär an dem Aufbau funktioneller Kanaltetramere beteiligt zu sein (Mosavi et al. 2004) (Schindl und Romanin 2007). Weitere konservierte Strukturmodule sind *Coiled-Coil*-Domänen sowie die sich im C-terminalen Bereich von S6 findende „*TRP domain*“. Letztere, welche nur in den Genen von TRPC und TRPM existiert, ist eine konservierte Sequenz von 25 Aminosäuren, welche mit der nahezu unveränderlichen „*TRP box*“ (**EWKFAR**) beginnt. Zudem enthalten TRPC und TRPM-Kanäle Prolin-reiche Sequenzen, welche als „*TRP box 2*“ bezeichnet werden (Ramsey et al. 2006). Alle TRP-Kanäle besitzen außerdem multiple Stellen für Regulation und Protein-Interaktionen, wie

Einleitung

beispielsweise Bindungsstellen für Calmodulin und PIP_2 (Zhu 2005). Zusätzlich bestehen mehrere mutmaßliche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC).

Erst der Aufbau der Kanaluntereinheiten zu Homo- oder Heterotetrameren führt zur Bildung funktioneller Kanäle, welche für Kationen selektiv sind (Abbildung 1.3). Die Fähigkeit der homologen TRP-Untereinheiten miteinander zu interagieren, bestimmt Stöchiometrie und Komposition der Heterotetramere (Lepage et al. 2006). Ob Homo- oder Heterotetramere gebildet werden, hängt von den einzelnen TRP-Kanälen ab. Zudem ist die physiologische Bedeutung solcher Kanalkomplexe oft unklar (Hellwig et al. 2005).

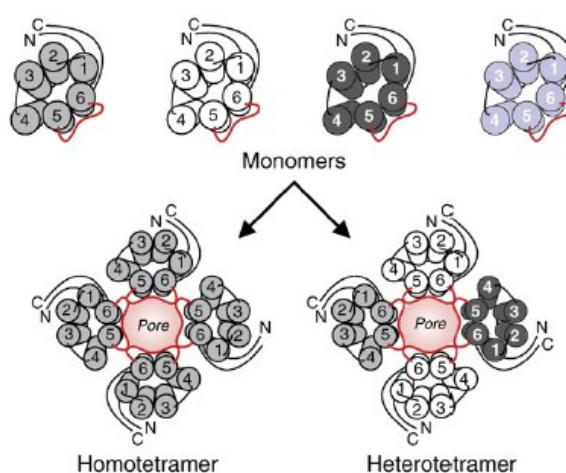


Abb. 1.3: Funktionelle Zusammensetzung der TRP-Monomere zu Tetrameren. Die TRP-Monomere setzen sich entweder zu Homomeren oder zu aus bis zu drei TRP-Isoformen bestehenden Heterotetrameren zusammen, um funktionelle Kanäle zu bilden. Diese sich daraus ergebende zentrale Pore ist für Ionen durchlässig [nach (Firth et al. 2007)].

Eine weitere Besonderheit ist das Vorkommen mehrerer *splice*-Varianten einiger Mitglieder der TRP-Familie, wie beispielsweise TRPV4 (Arniges et al. 2005) und TRPM3, welche zusätzlich Aktivität und Zusammensetzung der Kanäle regulieren. Die Fähigkeit der TRP-Kanäle untereinander funktionelle Kanäle zu bilden, ermöglicht sowohl die Bildung verschiedener Kationenkanäle als auch die Regulation verschiedenster Zellfunktionen des kardiovaskulären Systems. (Watanabe et al. 2008).

1.3.4 Permeabilität und Steuerung von TRP-Kanälen

TRP-Kanäle wirken als zelluläre Sensoren in vielen Zelltypen, sind an der Homeostase von Ionen durch Bereitstellen einer Route für den transzellulären Transport und an der Regulation der Funktion intrazellulärer Organellen beteiligt. Die meisten von ihnen tragen als Einstromwegen für Calciumionen (Ca^{2+}) aus dem Extrazellulärraum oder aus intrazellulären Organellen bei. Die TRP-Kanäle tragen zu Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ direkt als Einstromkanäle für Ca^{2+} oder indirekt durch Veränderung des Membranpotentials bei, um so die treibende Kraft für Ca^{2+} zu modulieren. Fast alle

Einleitung

funktionell charakterisierten TRP-Kanäle sind für Ca^{2+} permeabel. Ausnahmen sind TRPM4 und TRPM5, welche ausschließlich für monovalente Kationen durchlässig sind. Meiste ist die Selektivität der TRP-Kanäle mit einem relativen Permeabilitätsverhältnis $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ zwischen 0,3 bis 10 sehr gering (Nilius 2007).

Die meisten TRP-Kanäle können durch diverse Stimuli gesteuert werden und wirken als primäre Signalmoleküle in der Zelle. Dies beinhaltet das Binden intrazellulärer und extrazellulärer Botenstoffe (Messenger), Temperaturveränderungen sowie chemischer und/oder physikalischer Stress (Clapham 2003). Mögliche Aktivierungswege erfolgen über PLC (Estacion et al. 2001) (dabei insbesondere über die Subtypen $\text{PLC}\beta$ und $\text{PLC}\gamma$), Lipide (DAG, AA), *Shear Stress* und Radikale. Für die meisten TRP-Kanäle konnten aktivierende Liganden gefunden werden, die entweder endogen, Derivate natürlicher Komponenten oder rein synthetische Komponenten sind. Zudem scheinen einige TRP-Kanäle konstitutiv offen zu sein, beispielsweise TRPV5 und TRPV6. Andere werden durch den Füllungszustand intrazellulärer Speicher gesteuert (SOC) (Watanabe et al. 2008) (Nilius et al. 2007).

1.3.5 Die TRPC-Unterfamilie

Von allen TRP-Familien weist die zuerst entdeckte TRPC-Unterfamilie (Wes et al. 1995) die größte Homologie zu dTRP auf. Aufgrund von Sequenzhomologie und funktioneller Verwandtschaft können diese nicht-selektiven, Ca^{2+} -permeablen Kationenkanäle in vier Unterfamilien unterteilt werden: TRPC1, TRPC2, TRPC4/5 und TRPC3/6/7 (Pedersen et al. 2005). Ihr Permeabilitätsverhältnis ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$) unterscheidet sich deutlich zwischen den einzelnen Mitgliedern der Familie. Teilweise gibt es sogar unterschiedliche Daten zu einem Kanal. Zudem können mehrere TRPC-Kanäle Heteromultimere in vivo und in vitro bilden (Hoffman et al. 2002), wobei sich die Kanaleigenschaften deutlich zwischen den Homo- und Heteromeren exprimierenden Zellen unterscheiden (Strubing et al. 2001). TRPC2 kodiert im humanen Genom für ein Pseudogen (Vannier et al. 1999). In Abbildung 1.4 ist der schematische Aufbau der TRPC-Unterfamilie dargestellt.

Alle Kanäle der TRPC-Familie können durch Stimulation von Rezeptoren aktiviert werden, die verschiedene Isoformen der PLC aktivieren und durch Calmodulin oder andere Proteine moduliert werden (Venkatachalam et al. 2003), (Hardie 2007). TRPC3, TRPC6 und TRPC7 werden zudem, unabhängig von der Stimulation der Proteinkinase C (PKC), durch Diacylglycerol (DAG) aktiviert (Hofmann et al. 1999).

1.3.6 Die TRPV-Unterfamilie

Die TRPV-Familie (Abbildung 1.4) besteht in Säugern aus sechs Mitgliedern. TRPV1 bis TRPV4 sind durch positive Temperaturveränderung aktivierte Ionenkanäle (Voets et al. 2004), die nicht-selektiv für Ca^{2+} und nur gering für Ca^{2+} permeabel ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ zwischen 1 und 10) sind. Zudem wirken TRPV1

bis TRPV4 als Chemosensoren für eine Vielzahl endogener und synthetischer Liganden sowie auf physikalische Reize (Vriens et al. 2009). Die verschiedenen chemischen und physikalischen aktivierenden Stimuli können einen additiven oder super-additiven Effekt auf die Steuerung der TRPV-Kanäle (Nilius et al. 2005) haben.

Eine weitere Gruppe bilden TRPV5 und TRPV6. Sie sind die am höchsten für Ca^{2+} selektiven TRP-Kanäle (Voets et al. 2004) und werden durch die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eng reguliert.

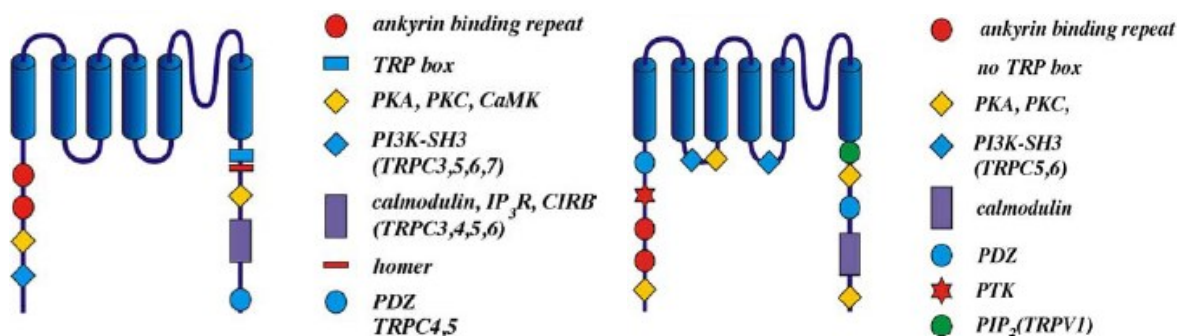


Abb. 1.4: Struktureller Aufbau der TRPC- und TRPV-Unterfamilie (Pedersen et al. 2005).

1.3.7 Die TRPM-Unterfamilie

Mitglieder der TRPM Familie (Abbildung 1.5) können, aufgrund von Sequenzhomologie, in drei Untergruppen unterteilt werden: TRPM1/3, TRPM4/5 und TRPM6/7, wobei TRPM2 und TRPM8 strukturell unterschiedliche Kanäle darstellen. Einzigartig ist das Vorhandensein einer funktionellen enzymatischen Domäne am C-Terminus von TRPM2, TRPM6 und TRPM7 (Levitan und Cibiulsky 2001).

TRPM-Kanäle weisen eine unterschiedliche Permeabilität für Ca^{2+} und Mg^{2+} auf. Dies geht von impermeabel für Ca^{2+} (TRPM4, TRPM5) bis hoch durchlässig für Ca^{2+} und Mg^{2+} (TRPM6, TRPM7 sowie bestimmte *Splice*-Varianten von TRPM3). Auch der Steuerungsmechanismus variiert deutlich zwischen den einzelnen TRPM-Kanälen (Kraft und Harteneck 2005), (Perraud et al. 2001), (Nadler et al. 2001), (Peier et al. 2000) (Bavencoffe A et al. 2011). Für den zuerst entdeckten TRPM1, der ein Melanozyten-spezifisches Gen ist, gibt es noch keine funktionelle Charakterisierung (Duncan et al. 1998).

1.3.8 Die TRPA Unterfamilie

Diese Familie besteht nur aus einem einzigen Mitglied in Säugern, TRPA1 (Abbildung 1.5). TRPA1 weist 14 *ankyrin repeats* auf, welche relevant sind für die mögliche Bedeutung des Kanals als Mechanosensor (Corey et al. 2004). Es gibt Daten, dass TRPA1 durch schmerzhafte Kälte (Karashima et al. 2009) und durch stechendscharfe Substanzen, wie Isothiozyanate oder Methylsalicylate, sowie Δ^9 -Tetrahydrocannabinol aktiviert wird (Nilius et al. 2007).

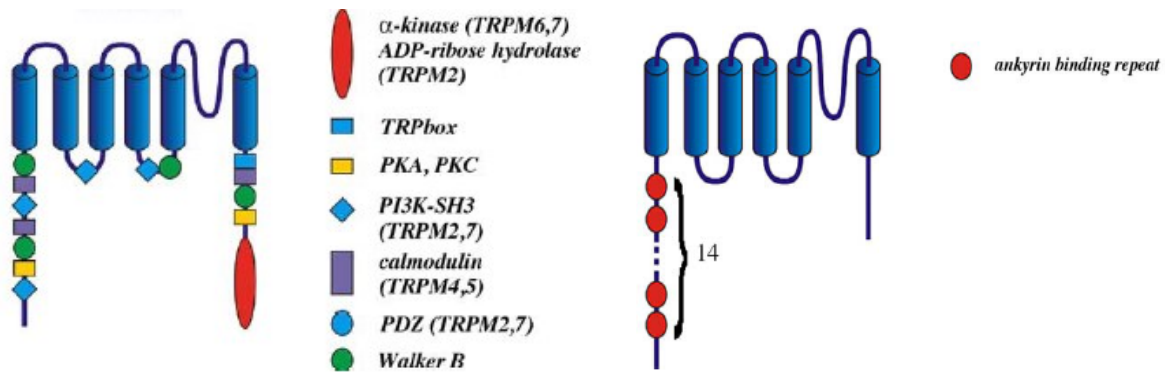


Abb. 1.5: Struktureller Aufbau der TRPM- und TRPA-Unterfamilie (Pedersen et al. 2005).

1.3.9 Die TRPML-Unterfamilie

Die Mitglieder der TRPML-Familie sind drei, noch nicht vollständig charakterisierte Proteine, die aus weniger als 600 Aminosäuren bestehen. Sie sind vermutlich in intrazellulären Vesikeln lokalisiert. Am besten untersucht worden ist TRPML1, der eine Rolle bei der endosomalen Azidifizierung spielt, und dessen Mutationen mit der neurodegenerativen lysosomalen Speichererkrankung Mukopolysaccharidose IV assoziiert sind (Cantiello et al. 2005). Über TRPML2 und TRPML3 ist wenig bekannt. Die schematische Struktur ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

1.3.10 Die TRPP-Unterfamilie

Von der TRPP-Familie, die sehr inhomogen ist, gehören nur folgende Mitglieder der Polyzystin-2 Gruppe zu den TRP-Kanälen (Abbildung 1.6): TRPP1 (PKD2), PKD2like1 und PKD2like2 (Delmas 2004). Mitglieder der Polyzystin-1 Gruppe werden nicht als den TRP zugehörig definiert, aufgrund ihrer Struktur aus 11 Transmembrandomänen. Allerdings wird vermutet, dass sie mit Mitgliedern der Polyzystin-2 Gruppe funktionelle Kanäle bilden können. Die autosomal dominante Form der Zystennieren (ADPKD) entsteht durch Mutationen im Gen von TRPP1 oder TRPP2 (Clapham 2003).

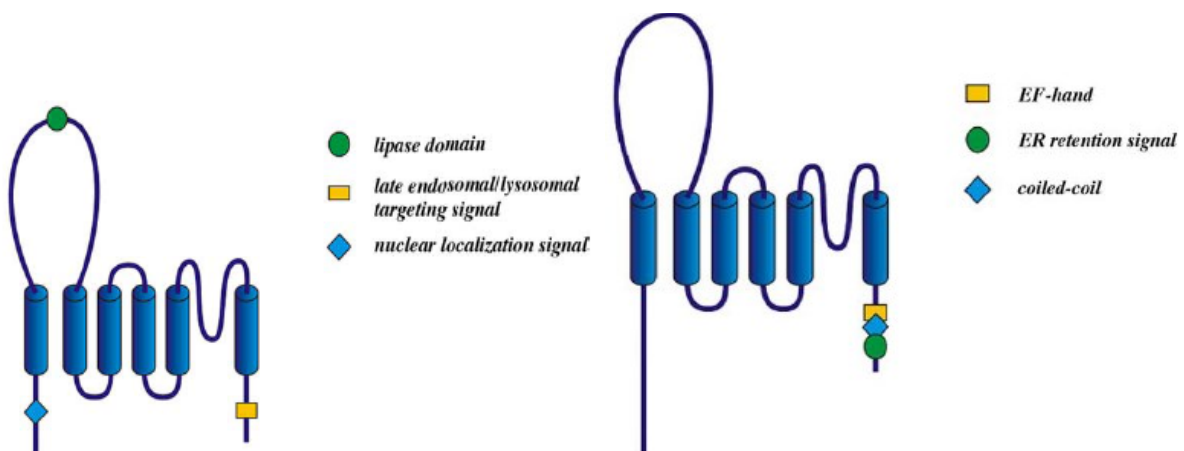


Abb. 1.6: Der strukturelle Aufbau der TRPML- und TRPP-Unterfamilie (Pedersen et al. 2005).

TRP-Kanäle sind an einer Reihe verschiedener physiologischer Vorgänge beteiligt und viele Isoformen werden in mehreren Geweben exprimiert (Kunert-Keil et al. 2006). Selten jedoch ist die spezifische physiologische Bedeutung individueller TRP bekannt. Demzufolge ist es wichtig, die Physiologie der einzelnen TRP-Kanäle sowie ihre Bedeutung bei humanen Erkrankungen zu untersuchen (Kiselyov et al. 2007).

1.4 TRP-Funktionen bei Endothelstimulation

Als Endothelstimulation bezeichnet man rasche, innerhalb von Minuten ablaufende, reversible Reaktionen ohne Proteinneusynthese. Dazu gehört die Erhöhung der vaskulären Permeabilität durch Histamin oder weitere vasoaktive Mediatoren, die Inhibierung der endothelialen NO-Freisetzung sowie die Umverteilung des luminalen Adhäsionsmoleküles P-Selektin durch Thrombin- oder Histaminstimulation. Endothelzellen verschiedenen Ursprungs exprimieren eine Vielzahl von membranösen Ionenkanälen und allgemein auch zahlreiche TRP-Kanäle (Kohler et al. 2001), (Yip et al. 2004), deren Expression durch eine Vielzahl von Stimuli reguliert wird. Oft ist noch ungeklärt, welche dieser Kanäle eine funktionelle Bedeutung im kardiovaskulären System haben. Um die weitreichenden physiologischen Funktionen von TRP-Kanälen zu verstehen, ist es erforderlich, die allgemeinen Aspekte ihrer Regulation und Modulation zu verstehen. Hierfür spielen zwei Mechanismen eine besondere Bedeutung:

Eine Möglichkeit ist die Regulation der Aktivität durch Protein-Protein-Interaktion oder direkte Phosphorylierung mittels Proteinkinase C. Ein interessanter Aspekt hierfür ist die Interaktion mit und Modulation durch Phosphatidylinositolphosphate (PIPs) der Plasmamembran, welche für funktionelle Änderungen der TRP-Kanal-Aktivität bedeutsam sind (Nilius et al. 2006), (Nilius et al. 2008).

Eine andere Variante ist die Modulation der TRP-Funktion mittels regulierender Faktoren. Als Reaktion auf verschiedene Substanzen (aus autonomen und sensorischen Nerven oder Thrombozyten, zirkulierende Hormone, Autakoide, Zytokine und Pharmaka), sowie auf physikalische oder chemische Stimuli, synthetisieren und setzen Endothelzellen verschiedene Faktoren frei. Diese modulieren sowohl die Funktionen benachbarter Zellen wie auch die der Endothelzelle selber. Dadurch können beispielsweise Angiogenese, inflammatorische Reaktionen, Homeostase sowie vaskulärer Tonus und Permeabilität moduliert werden. Diese Modulationen erfolgt insbesondere durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Phospholipase C mit daraus folgender Erhöhung der freien $[Ca^{2+}]_i$. Ein Beispiel hierfür ist TRPM7 (Langeslag et al. 2007).

In Endothelzellen ist der Ca^{2+} -Einstrom ein bedeutsames Ereignis, das durch vasoaktive und pro-angiogenetische Faktoren getriggert wird, welche an GPCRs bzw. Rezeptor-Tyrosinkinasen

gebunden sind (Antoniotti et al. 2002). Ein wesentlicher Hinweis für die Bedeutung von TRP-Kanälen bei dem durch Agonisten induzierten Ca^{2+} -Einstrom stammt von TRPC4^(-/-)-Mäusen. Diese weisen eine deutlich verminderte Agonisten-induzierte Vasorelaxation auf. Grund hierfür ist ein verminderter durch Acetylcholin und ATP stimulierter Ca^{2+} -Einstrom in Endothelzellen (Freichel et al. 2001). Der Ca^{2+} -Einstrom über TRPC4 könnte zur Bildung endothelialer Vasorelaxantien führen (NO, EDHF oder Prostazyklin) und dadurch den Gefäßtonus reduzieren. Zudem scheint TRPC4 an der Regulation der transzellulären Permeation der Endothelschicht in vivo beteiligt zu sein, da der durch Thrombin-induzierte Ca^{2+} -Einstrom in pulmonalarteriellen Endothelzellen in TRPC4^(-/-)-Mäusen nicht mehr vorhanden ist (Tiruppathi et al. 2002).

Weitere Beispiele sind die Stimulation von TRPC6 in mikrovaskulären Endothelzellen aus murinen Herzen durch Bradykinin oder die mögliche Rolle von TRPC1 bei der Regulation der vaskulären Permeabilität. Auch andere TRP-Kanäle könnten durch spezifische Agonisten aufgrund ähnlicher Aktivierungsmechanismen in Endothelzellen aktiviert werden.

Obwohl Ca^{2+} essentiell für viele endotheliale Funktionen ist, wie beispielsweise die normale Beschaffenheit der Integrität der Endothelzelle, kann die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Dysfunktion der Barriere führen. Entzündliche Agonisten, wie Thrombin, Histamin, Bradykinin, und Oxidantien vermitteln eine erhöhte endotheliale Permeabilität durch Aktivierung Ca^{2+} -sensitiver Signalwege in Endothelzellen (Tiruppathi et al. 2003). Neben dieser durch Agonisten induzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, können auch hämodynamische Scherkräfte eine Vielzahl von intrazellulären Ereignissen, die die Gefäßstruktur beeinflussen, in Abwesenheit eines Liganden mittels GPCRs stimulieren. All dies könnte zu der Entwicklung kardiovaskulärer Pathologien beitragen.

1.5 Vasoaktive Faktoren

Vasoaktive Substanzen, zu denen sowohl relaxierende, wie Bradykinin und Acetylcholin, als auch konstringierende, wie Endothelin-1 und Angiotensin II gehören, werden aus Zellen des Gefäßsystems freigesetzt oder zirkulieren im Blut. Sie binden an ihre Rezeptoren, meist GPCRs oder Rezeptor-Tyrosinkinasen, und beschleunigen dadurch die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dies stimuliert wiederum die Endothelzellen, eine Vielzahl von vasoaktiven Substanzen zu generieren. Diese induzieren hierdurch den Ca^{2+} -Einstrom in die glatten Gefäßmuskelzellen und tragen somit zu Veränderungen von Gefäßtonus und Blutdruck bei. Aufgrund der besonderen Bedeutung von TRP-Kanälen bei der Vermittlung des Ca^{2+} -Einstroms als Reaktion auf vasoaktive Substanzen könnte eine veränderte Expression von TRP-Kanälen dadurch die Endothel-abhängige Vasorelaxation stören. Ein Beispiel hierfür ist der, durch ATP aktivierte, TRPC5 in kultivierten Endothelzellen von

Einleitung

Rinderaorten (Kwan et al. 2007). Die Wirkung von Bradykinin, Endothelin-1 und Histamin auf die Endothelzelle werden in Abbildung 1.7 dargestellt.

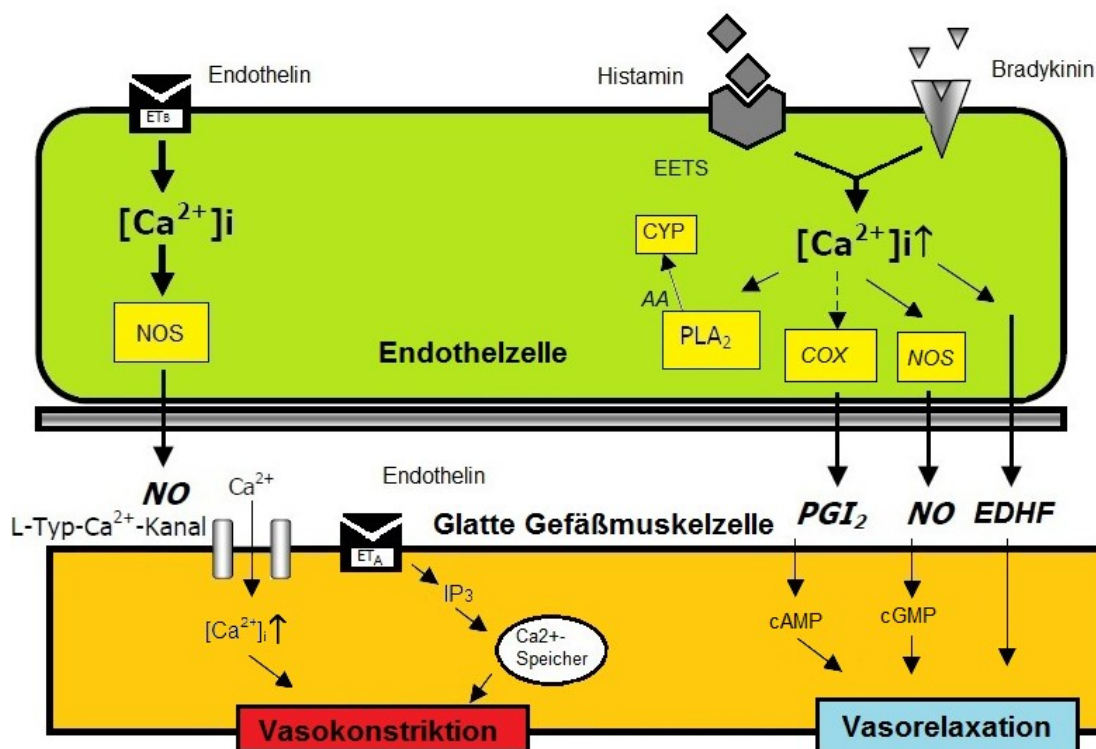


Abbildung 1.7: Veränderung des Gefäßmuskeltonus durch vasoaktive Substanzen. Schematische Darstellung der durch Endothelin, Bradykinin und Histamin verursachten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in Endothelzellen und dadurch Wirkung auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur [modifiziert nach (Kohler et al. 2007)].

Obwohl die basale Freisetzung von NO ein von Ca^{2+} unabhängiger Prozess ist, wird die eNOS durch Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ stimuliert. Hierdurch kommt es zu einer stärkeren Produktion und Freisetzung von NO aus Endothelzellen. Dies erfolgt u.a. G-Protein-Rezeptor-gekoppelt mittels Bradykinin. Durch Aktivierung von Kinin-Rezeptoren, insbesondere dem Bradykinin-2-Rezeptor, kommt es zu einer, durch Bradykinin vermittelten, Vasodilatation durch Stimulierung der Freisetzung von NO, PGI₂ sowie EDHF aus dem Endothel (Harris et al. 2001).

Auch Histamin, eine bekannte vasoaktive Substanz, führt zur Vasodilatation über Modulation der eNOS-Aktivität. Des Weiteren ist bekannt, dass Histamin bedeutsam für die Regulation der Zykllooxygenase-2 (COX-2) in Endothelzellen ist und somit eine wichtige Rolle in der Prostanoid-Homeostase einnimmt (Tan et al. 2007).

Endothelin-1 (ET-1) ist der potenteste bekannte Vasokonstriktor und wird insbesondere von Endothelzellen produziert und freigesetzt (Yanagisawa et al. 1988). Zusätzlich ist das Peptid an der Proliferation und Hypertrophie glatter Gefäßmuskulatur beteiligt. Jedoch ist die Wirkung von

Endothelin-1 konzentrationsabhängig: In niedriger Konzentration führt Endothelin-1 über Aktivierung von ET_B -Rezeptoren, die an die Freisetzung von NO, Prostazyklin und EDHF gekoppelt sind, zur Vasodilatation (Mazzuca and Khalil 2012). In hoher Konzentration hingegen führt es zu einer deutlichen Kontraktion durch Aktivierung von ET_A -Rezeptoren und in einigen Blutgefäßen durch Aktivierung von ET_B -Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur (Boulanger 1999). Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ ist essentiell für die durch Endothelin-1 vermittelte Vasokonstriktion. Obwohl der Endothelinspiegel im Plasma von WKY- und SHR-Ratten ähnlich oder nur leicht erhöht ist, ist die Konzentration im Plasma von den stärker hypertonen SHRsp-Ratten dauerhaft erhöht. Hier trägt Endothelin-1 auch zu Endorganschäden und Gefäßumbau, jedoch nur geringfügig zum erhöhten Blutdruck, bei (Schiffrin et al. 2005).

1.6 Der Einfluss pro-angiogenetischer Faktoren

Verschiedene Aspekte der endothelialen Funktion sowie komplexe Prozesse werden durch Wachstumsfaktoren reguliert. Extrazelluläre Angiogenesefaktoren, wie VEGF, bFGF oder PDGF, stimulieren die Proliferation und Migration von Endothelzellen und begünstigen dadurch die Angiogenese. Ca^{2+} spielt dabei eine bedeutende Rolle. TRP-Kanäle könnten an dem durch pro-angiogenetische Agonisten induzierten Ca^{2+} -Einstrom in Endothelzellen beteiligt sein.

Ein gut charakterisierter Agonist ist bFGF, der einen potenten myogenen und proliferativen Effekt auf Endothelzellen ausübt. Es konnte gezeigt werden, dass TRPC1 an dem, durch einen biologisch relevanten Agonisten (wie bFGF), aktivierten Ca^{2+} -Einstrom in nativen Endothelzellen beteiligt ist (Antoniotti et al. 2002).

Ein besonders wichtiger Wachstumsfaktor mit Bedeutung für das kardiovaskuläre System ist VEGF. Die biologische Aktivität hängt dabei von der Reaktion mit spezifischen Rezeptoren ab. VEGFA, ein endothelialer Wachstumsfaktor, spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Angiogenese, Vasodilatation und Gefäßpermeabilität. Dies erfolgt mittels einer komplexen Signalkaskade über Aktivierung des endothelialen VEGF-Rezeptors-2 (VEGFR-2), einer Rezeptor-Tyrosinkinase und führt zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ sowie einem VEGF-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom (Nilius und Droogmans 2001). Dabei induziert VEGF einen Rezeptor-operierten Kationenstrom (ROC) in humanen mikrovaskulären Endothelzellen, dem hauptsächlich Wirkort von VEGF, der ähnliche Charakteristika wie Ströme von TRPC3 oder TRPC6 aufweist (Cheng et al. 2006).

Zudem scheint ein TRPC-Kanal an der durch VEGF stimulierten Proliferation und Migration von Endothelzellen beteiligt zu sein (Dietrich et al. 2007). Die TRP-Kanäle tragen möglicherweise zum

Einleitung

Gefäßumbau über zwei verschiedene Mechanismen bei: Zum einen könnten proliferative Faktoren TRP-Kanäle aktivieren und mit der sich daraus ergebenden Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ Signaltransduktionskaskaden modulieren, wodurch es zum Umbau kommt. Und zum anderen könnte der Ca^{2+} -Einstrom über TRP-Kanäle Endothelzellen stimulieren pro-angiogenetische Faktoren zu generieren und freizusetzen, was dann den Gefäßumbau vereinfacht (Yao und Garland 2005). Des Weiteren gehört VEGF zu den Modulatoren der eNOS und könnte darüber ebenfalls Einfluss ausüben.

Eine weitere pro-angiogenetische Substanz mit Effekten auf das kardiovaskuläre System ist Erythropoetin. Es ist bekannt, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, welche mit dem rekombinanten, humanen rhEpo therapiert werden, einen Therapie-induzierten Hypertonus erleiden können. Zudem ist Erythropoetin in der Lage, die Produktion endothelialer vasoaktiver Modulatoren, wie Endothelin-1, zu stimulieren. Dabei wird Erythropoetin über einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus freigesetzt. Auch vasodilatatorische Substanzen, wie VEGF, werden von kultivierten Endothelzellen, welche mit rhEpo behandelt werden, freigesetzt (Jelkmann und Wagner 2004).

In Abbildung 1.8 werden einige der endothelialen Wirkungen von VEGF und Erythropoetin auf die Endothelzelle gezeigt.

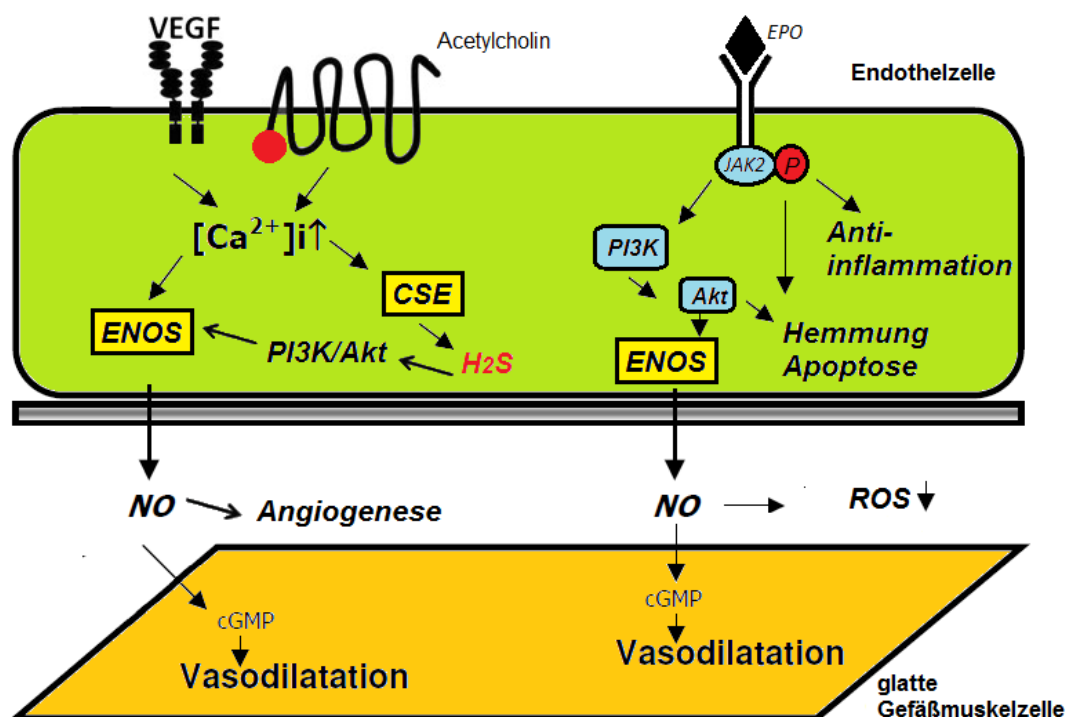


Abbildung 1.8: Wirkungen von VEGF und Erythropoetin auf die Endothelzelle. Schematische Darstellung der durch VEGF und Erythropoetin verursachten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in Endothelzellen [modifiziert nach (Kohler et al. 2007)].

1.7 Endotheliale Dysfunktion und Hypertonie

Die besondere Bedeutung des Endothels für die Funktion des vaskulären Systems wird durch seine Bedeutung bei der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen deutlich. Als endotheliale Dysfunktion kann die Störung der Endothelzellfunktion definiert werden, bei der u.a. die Balance der endothelialen Produktion von vasorelaxierenden und vasokonstringierenden Faktoren gestört ist. Dies kann durch diverse intrinsische und extrinsische Faktoren induziert werden. Häufig scheint oxidativer Stress die Ursache zu sein, der sich als verminderte Bioverfügbarkeit von NO, endothelialer Barriervedysfunktion, gestörter Regulation des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur, antithrombogener Eigenschaften sowie angiogener Kompetenz manifestiert. Grund hierfür ist, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS= *reactive oxygen species*) die vom Endothel-abhängige Vasodilatation inhibieren können. Zudem vermitteln ROS über vereinfachte Mobilisation von Ca^{2+} und erhöhte Sensibilität kontraktile Proteine für Ca^{2+} die Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen. Bei Hypertonie geht die endotheliale Dysfunktion dem Auftreten des erhöhten Blutdruckes oft voraus (Feletou und Vanhoutte 2006).

Defekte von Ionenkanälen haben einen weitreichenden Einfluss auf das Verständnis mehrerer Erkrankungen. Multiple Isoformen der TRP-Kanäle werden in VEC und SMC exprimiert und können zu endothelialer Dysfunktion beitragen (Wong und Yao 2011). Dabei kann die Expression von TRP-Kanälen in SMCs und VECs zu unterschiedlichen physiologischen Effekten führen: Der durch TRP-Kanäle vermittelte Ca^{2+} -Einstrom in glatten Gefäßmuskelzellen führt zu Vasokonstriktion, Proliferation glatter Gefäßmuskeln sowie Stimulation von Mediahypertrophie. Andererseits stimuliert der Ca^{2+} -Einstrom in die Endothelzelle sowohl die Produktion hyperpolarisierender als auch relaxierender Faktoren (Firth et al. 2007). In diversen Gefäßbetten, sowohl bei primär als auch sekundär hypertensiven Patienten, ist die Endothel-abhängige Vasodilatation auf physikalische (Scherkräfte) und/oder pharmakologische (Bradykinin, Acetylcholin, Substanz P) Stimuli gestört (Feletou und Vanhoutte 2006). So gibt es Hinweise, dass die endothelialen TRPA1-Kanäle zur Endothel-abhängigen Vasodilatation führen und somit eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus hat (Earley et al. 2009).

Auch andere TRP-Kanäle, wie TRPC4 oder TRPC6 (Welsh et al. 2002), sind an der Regulation des vaskulären Tonus beteiligt. Zudem könnten TRPV1 und TRPV4 eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Gefäßtonus haben, da in TRPV4^(-/-)-Mäusen die Fluss-induzierte Vasodilatation deutlich beeinträchtigt ist (Kohler et al. 2006), (Hartmannsgruber et al. 2007). Beide Kanäle werden mittels des Endocannabinoids Amandamid und 2-AG aktiviert, die wiederum selber eine eigene Endothel-abhängige und Endothel-unabhängige Vasorelaxation vermitteln (Yao und Garland 2005).

Einleitung

Neben Veränderungen der Signalkaskaden für Ca^{2+} spielt auch Mg^{2+} eine wichtige Rolle bei vielen biochemischen Reaktionen zur Regulation von vaskulärem Tonus und endothelialer Integrität. Eine verminderte Mg^{2+} -Konzentration wurde mit gestörter vaskulärer Reaktivität, endothelialer Dysfunktion, vaskulärer Inflammation und strukturellem Umbau assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass Expression und Aktivität des für Mg^{2+} permeablen TRPM7 in SMCs von SHR-Ratten vermindert ist. Zudem war die Agonisten-induzierte Vasokonstriktion mittels Angiotensin II beeinträchtigt und die $[\text{Mg}^{2+}]_i$ verändert (Touyz et al. 2006).

Des Weiteren lassen verschiedene Daten vermuten, dass auch weitere mit endothelialer Dysfunktion assoziierte Phänomene mit der Malfunktion und Dysregulation von TRP-Kanälen assoziiert sind. So führt die Dysregulation von TRPC4 und TRPC1 zu einer gestörten vaskulären Endothelbarriere (Tiruppathi et al. 2002), die verminderte Aktivität von TRPV4 reduziert Fluss-induzierte Gefäßantworten und die Aktivität von TRPC3 und TRPC4 ist mit endothelialer Schädigung durch oxidativen Stress assoziiert (Yao und Garland 2005).

Obwohl Malfunktion von TRP-Kanälen den Ca^{2+} -Einstrom beeinträchtigen können, könnte NO selber auch die Aktivität von TRP-Kanälen durch Feedback-Mechanismen modulieren. Möglich hierfür wäre eine durch NO vermittelte Aktivierung verschiedener TRP-Isoformen (TRPC5, TRPV1, TRPV3, TRPV4) durch Cystein S-Nitrosylierung. Jedoch können NO, cGMP und Proteinkinase G auch zahlreiche TRP-Kanäle in Endothelzellen (TRPC3, TRPC6, TRPM4) durch einen negativen Feedback Mechanismus hemmen. Diese Feedback-Mechanismen könnten als NO-Sensoren wirken, die die endothelialen NO-Spiegel fein justieren. Eine Dysregulation dieses Systems könnte daher zu endothelialer Dysfunktion beitragen (Kwan et al. 2007).

Trotz der großen Anzahl von Daten über TRP-Kanäle konnte bisher nur in wenigen Fällen ein direkter Zusammenhang zwischen Dysfunktion einzelner TRP-Kanäle und Fehlfunktion des Endothels gezeigt werden. Daher ist die Bedeutung vieler TRP-Isoformen oft spekulativ.

1.8 Fragestellung

Die Bedeutung von TRP-Kanälen in humanen Endothelzellen ist bislang nicht abschließend geklärt. Wie bereits dargestellt exprimieren Endothelzellen eine Vielzahl von Membranionenkanälen, was die funktionelle Bedeutung dieser Zellen und der daran angrenzenden glatten Gefäßmuskelzellen untermauert. Besondere Bedeutung weist dabei die Kontrolle des Ca^{2+} -Einstroms und die Modulation des Membranpotentials der Endothelzelle auf. Die Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgt sowohl über die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Intrazellulärraum als auch über den extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom. Der extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom wird unter anderem über nicht-selektive Kationenkanäle vermittelt, u.a. auch TRP-Kanäle (Firth et al. 2007). Zahlreiche Studien haben das Expressionsmuster von TRP-Kanälen in Endothelzellen untersucht. Diese Daten konnten zeigen, dass alle TRPCs (außer TRPC7), TRPV1, TRPV3, TRPV4 sowie alle TRPMs (außer TRPM5) in Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs exprimiert werden (Yip et al. 2004), (Yao und Garland 2005), (Watanabe et al. 2008) (Earley und Brayden 2010). Bekannt ist, dass Endothelzellen unterschiedlicher Gefäßbetten und unterschiedlicher Tierarten verschiedene TRP-Kanäle exprimieren können. Für viele TRP-Kanäle ist noch ungeklärt, welche dieser Kanäle eine funktionelle Bedeutung im vaskulären System haben. Weiterhin ist unklar, ob und wie die einzelnen TRP-Kanäle bei Stimulation des Endothels moduliert werden.

Daraus ergaben sich folgende Hypothesen, die experimentell untersucht werden sollten:

Mit der Messung von RNA-Expressionsprofilen kann die physiologische oder pathophysiologische Expression der mRNA einer Zelle oder eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt erfasst werden. Obwohl die Expression diverser TRP-Kanäle bereits in verschiedenen Zellarten, so auch in Endothelzellen, beschrieben wurde, gibt es weiterhin widersprüchliche Daten in Abhängigkeit von der Lokalisation und der Herkunft der Endothelzellen. Demzufolge stellte sich die Frage nach dem Vorhandensein aller 28 humanen Mitglieder der TRP-Familie in mikrovaskulären Endothelzellen des Menschen (HMEC-1) mittels systematischer Untersuchung sowie die Frage nach der quantitativen Zusammensetzung in HMEC-1. Dies sollte mittels der semiquantitativen Technik der *real-time* RT-PCR erfolgen. Zusätzlich sollte noch mittels Linearitätsanalysen die Qualität jedes Primers validiert werden.

Da TRP-Kanäle als multifunktionelle zelluläre Sensoren wirken und an zahlreichen fundamentalen zellulären Funktionen, wie Kontraktion, Proliferation und Zelltod, beteiligt sind, ist die Untersuchung ihrer Bedeutung bei Erkrankungen des Menschen von großem Interesse. Wenig ist bekannt über die Aktivierung und Modulation dieser Ionenkanäle in Endothelzellen. Demzufolge sollte untersucht werden, ob die Stimulation der HMEC-1 mit verschiedenen pro-angiogenetischen (VEGF,

Einleitung

Erythropoetin) und vasoaktiven Faktoren (Histamin, Bradykinin, Endothelin) zu einer Modulation der TRP-Expression führt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
Anchored Oligos	Thermo Scientific; Wedel, Deutschland
Aqua ad injectabile	Diaco, Serag-Wiessner KG; Naila, Deutschland
Bradykininacetat (B3259 –5MG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland
DMEM High Glucose	PAA; Pasching, Österreich
dNTP-Mix	peqLAB Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
Endothelin-1 (E7764 – 10UG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland
Erythropoetin	Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied
Ether	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck; Darmstadt, Deutschland
Gel Loading Buffer/solution, Typ I	Sigma; Saint Louis, Missouri, USA
High Pure Resolution RNA Isolation Kit (For small (mini) preparations of RNA)	Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science; Mannheim, Deutschland
Histamin (H7250 – 5G)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland
Midazolam	Roche Pharma AG; Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Natriumpyruvat	PAA; Pasching, Österreich
PBS mit/ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	PAA; Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA; Pasching, Österreich
peqGOLD 50bp DNA-Leiter	peqLAB Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
Primer Human	Proligo; Hamburg, Deutschland
Primer Human, Ratte	Sigma Genosys; Woodlands, TX, USA
Rerverse Transkriptase	Fermentas Life Science; St. Leon-Rot, Deutschland
RT-Buffer (5x)	Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Deutschland
SYBR® Green	Proligo; Hamburg, Deutschland

Trypsin 0,5%	PAA; Pasching, Österreich
VEFG (V7259)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland

2.1.2 Geräte

Gerät	Herstellende Firma
Inkubator	Heraeus; Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge	Thermo Electron Corporation; Karlsruhe, Deutschland
Mikrofuge (Heraeus Pico 17 Centrifuge)	Thermo Electron Corporation; Karlsruhe, Deutschland
Vortex-Gerät	Thermo Scientific; Wedel, Deutschland
Cycler	Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystems
Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland
Photometer	Thermo Scientific; Wedel, Deutschland
Präparierbesteck (Pinzetten, Scheren, Skalpell, Mikrodisektionsbesteck)	
Rührmagnet	
Standardlaborzubehör	
Sterile Bench (Thermo): Sterile Zellschaber (Greiner; Frickenhausen, Deutschland), Petrischalen (Sarstedt AG&Co.; Nümbrecht, Deutschland), Zellkulturflaschen (Greiner), Pipetten (Greiner), Eppendorfgefäße (Eppendorf; Hamburg, Deutschland), Zentrifugenröhrchen, Kryoröhrchen (Sarstedt)	

2.2 Zellkultur

Es wurden humane dermale mikrovaskuläre Zellen einer immortalisierten Zelllinie (HMEC-1) kultiviert und verwendet (Ades et al. 1992).

2.2.1 Kultivierung der Endothelzellen

Als Nährlösung für HMEC-1 diente DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) mit hoher Glucosekonzentration und Glutamin. Zusätzlich wurden dem Medium 10% FCS (Fetales Kälberserum), 2% Penicillin/Streptomycin sowie 1% Natriumpyruvat hinzugefügt. Die Zellen wurden im Inkubator in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und 5% CO₂ kultiviert. Bevor die Zellen umgesetzt wurden, wurde zunächst mikroskopisch untersucht, ob die HMEC-1 konfluent gewachsen waren und ob es mögliche Verunreinigungen mit anderen Zellen bzw. Bakterien/Pilzen gab. Waren die Petrischalen konfluent bewachsen, wurde zunächst das Medium abpipettiert, um anschließend die Petrischale mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ zu spülen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5%igem Trypsin für 5 Minuten inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde das Trypsin mittels PBS mit

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ inaktiviert. Die Zellen wurden nun in ein 15mL Zentrifugationsröhrung überführt und 5 Minuten bei 1000Rpm zentrifugiert. Nun wurde das überschüssige PBS abpipettiert und das Pellet mit vorbereitetem DMEM vorsichtig aufgelöst. Abschließend wurden die Zellen in gleichen Volumenanteilen in Petrischalen verteilt und mit zusätzlichen 7mL DMEM in den Inkubator zurückgestellt.

2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

2.3.1 Extraktion der mRNA

Waren die Petrischalen mit HMEC-1 konfluent bewachsenen, wurden die Zellen zunächst aus dem Inkubator genommen, das Medium vorsichtig abpipettiert und anschließend die Petrischale zweimalig mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gründlich gespült und schließlich 10mL PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ in jede Petrischale pipettiert. Nun wurden die Zellen mithilfe eines sterilen Zellschabers vorsichtig von der Petrischale gelöst und in 15mL Zentrifugationsröhrchen bei 1000Rmp 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurden die Anchored Oligos, der Reaktion Buffer, der dNTP-Mix, bestehend aus dATP, dGTP, dTTP sowie dCTP, und Aqua ad injectabile von -20°C vorsichtig aufgetaut. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200µL PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ aufgelöst. Zu dieser Zellsuspension wurde nun 400µL Reagenz 1 (Lysis/binding Buffer) gegeben, das Gemisch kurz mittels des Vortex-Geräts gemischt und in Reaktionsgefäße überführt, um für 30 Sekunden in der Mikrofuge mit 8000Rpm zentrifugiert zu werden. Der Überstand hiervon wurde verworfen und in das Reaktionsgefäß wurden 10µL Reagenz 2 (DNase) sowie 90µL Reagenz 3 (DNA Inkubation Buffer) pipettiert. Dies wurde nun 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500µL Reagenz 4 (Wash Buffer 1 mit Ethanol) hinzugegeben und das Gemisch wurde erneut für 30 Sekunden bei 8000Rpm zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und es wurden 500µL Reagenz 5 (Wash Buffer 2 mit Ethanol) in das Reaktionsgefäß pipettiert, um für 30 Sekunden bei 8000Rpm zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Nun wurden 200µL Reagenz 5 in das Reaktionsgefäß gegeben, welches anschließend 2 Minuten bei 13000Rpm zentrifugiert wurde. Das untere Stück des Reaktionsgefäßes wurde verworfen, während das obere Gegenstück in ein steriles Eppendorfgefäß überführt wurde. In Letzteres wurden 70µL Reagenz 6 (Elution Buffer) pipettiert. Anschließend wurde das Ganze für 1 Minute bei 8000Rpm zentrifugiert. In dem sterilen Eppendorfgefäß war nun die mRNA der Zellen isoliert.

2.3.2 Umschreiben von mRNA in cDNA

Um die isolierte mRNA in die stabilere cDNA umzuschreiben, wurden die Proben gecyclet, d.h. in mehreren Schritten erhitzt. Dafür wurde für jedes Eppendorfgefäß aus dem vorherigen Schritt

6 PCR-Gefäße, welche 200µL umfassen, vorbereitet mit je 1µL Anchored Oligos sowie 10µL von der isolierten mRNA. Diese vorbereiteten PCR-Gefäße wurden nun 5 Minuten auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde in jedes PCR-Gefäß je 2µL Aqua ad injectabile, 4µL Reaktionspuffer sowie 2µL dNTP-Mix, bestehend aus dATPs, dGTPs, dCTPs und dTTPs, pipettiert, so dass sich nun in jedem PCR-Tube 19µL Flüssigkeit befanden. Dann wurden die PCR-Gefäße für 5 Minuten auf 37°C erhitzt. Zuletzt wurde in jedes PCR-Gefäß 1µL Reverse Transkriptase gegeben und gründlich vermischt. Nun wurde das Gemisch erneut für 70 Minuten erhitzt, zunächst 60 Minuten auf 42°C und anschließend, zur Denaturierung des überschüssigen Enzyms, 10 Minuten auf 70°C. Zuletzt wurde das Gemisch auf 4°C abgekühlt. Die PCR-Gefäße mit der umgeschriebenen cDNA wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

2.3.3 Real Time-PCR

Die *Real-Time*-PCR (TaqMan™-PCR) ist eine Methode zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung der mRNA-Expression durch Detektion der entsprechenden Genexpression. Sie beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der dabei gewonnenen DNA. Dafür ist es zunächst erforderlich, die isolierte mRNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in die stabilere komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Bei der nun folgenden PCR erfolgt die Vervielfältigung der cDNA in 40 aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen, wovon jeder Zyklus sich in drei Reaktionsschritte gliedert. Zunächst wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) durch Erhitzen auf 94°C aufgetrennt. Daran anschließend erfolgt bei einer Temperatur von 60°C, der *annealing temperature*, die Hybridisierung der eingesetzten Primer mit der jeweils komplementären DNA-Sequenz. Zuletzt komplettiert die DNA-Polymerase durch Einbau der passenden Desoxynukleosid-5'-triphosphate (dNTPs) die Einzelstränge zum entsprechenden Doppelstrang. Dieser Vorgang wird als Elongation bezeichnet. Das Prinzip der RT-PCR wird in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

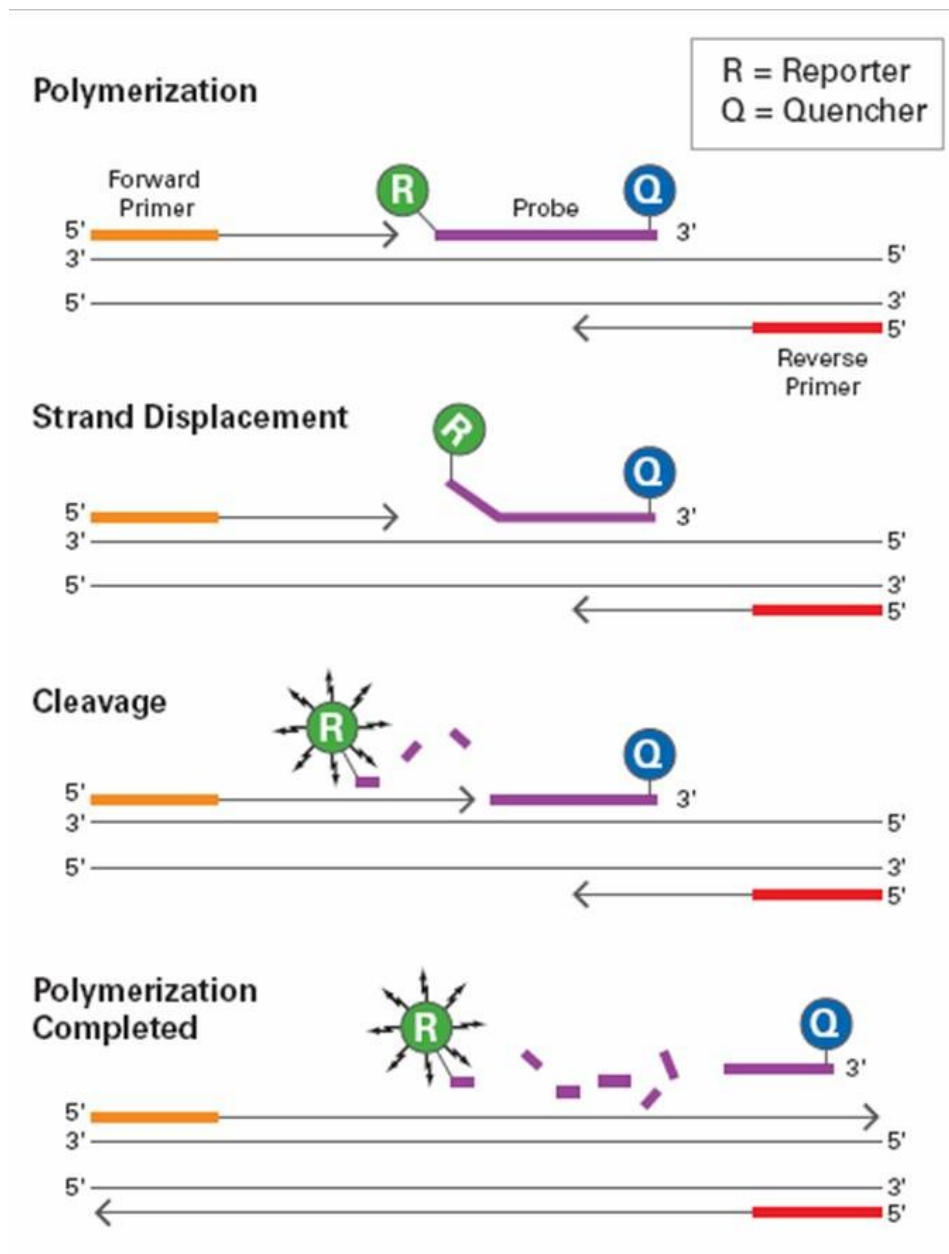


Abb. 2.1: Das Prinzip der quantitativen Real Time RT-PCR (TaqMan®-PCR) (Asuragen). Bei der Polymerisation werden eine Fluoreszenzmarker (R) und eine Quencher an das 5'- bzw. 3'-Ende der TaqMan®-Probe angehängt. Im nächsten Schritt erfolgt die Verschiebung des Strangs. Ist die Probe intakt, wird die Emission des Markers gequenched. Bei jedem nun folgenden Verlängerungszyklus, schneidet die DNA-Polymerase den Marker aus der Probe. Ist die Polymerisation beendet, sind Quencher und Marker voneinander getrennt. Sobald Marker und Quencher getrennt sind, emittiert der Marker sein charakteristisches Fluoreszenzmuster.

Zur praktischen Durchführung einer *Real-Time*-PCR erfolgte zunächst die Herstellung eines Mastermix. Für jede Probe ergab sich dabei eine Zusammensetzung von 2µL Primer *sense*, 2µL Primer *antisense* sowie 4µL Aqua ad injectabile. Im Verlauf wurde dazu noch 10µL SYBR Green I, ein interkalierender DNA-Farbstoff und somit der Marker R, gegeben. Der Mastermix erreichte ein Gesamtvolumen von insgesamt 18µL.

Die Herstellung der gebrauchsfertigen Primerlösung erfolgte, je nach Firma, unterschiedlich: bei Primern der Firma Sigma wurden je 10µL Primer mit 90µL Aqua ad injectabile verdünnt. Bei den Primern, die von Prologo synthetisiert worden waren, erfolgte die Gabe von je 10µL Primer in 190µL Aqua ad injectabile. Anschließend wurden in jedes Well 2µL Probe gegeben. Zum Ausschluss einer Kontamination mit DNA oder cDNA wurde pro RT-Ansatz jeweils eine Negativkontrolle (nTC) angesetzt, bei der statt der vorher verwendeten cDNA-Probe Aqua ad injectabile verwendet wurde. Da vWF ubiquitär von Endothelzellen exprimiert wird, gilt dieser als spezifischer Marker für Endothelzellen und wird routinemäßig verwendet, um Gewebe als Endothel zu identifizieren (Zanetta et al. 2000). Aus diesem Grund wurde ebenfalls vWF mituntersucht.

Die folgende qualitative und quantitative DNA-Detektion erfolgte mit Hilfe des *SYBR® Green I Assays* sowie des *ABI PRISM®-7500-Sequence Detection System*. Dafür wurde die Platte im Schritt 1 zunächst für 2 Minuten auf 50°C erhitzt, um dann im folgenden Schritt 2 15 Minuten lang auf 95°C erhitzt zu werden. Nun wurde die Platte 50 Mal je 15 Sekunden auf 95°C erhitzt; dies entspricht den PCR-Replikationszyklen der *real time*-PCR. Zuletzt wurde die Platte für den Zeitraum einer Minute auf 60°C gesetzt.

Die verwendeten Primer wurden mit *Primer Express Software* erstellt. Es wurden folgende in genspezifische Sequenzen verwendet, wobei die in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen denen der humanen Primer entsprechen.

Tabelle 2: Primersequenzen der verwendeten humanen Primer

Tabelle 2.1: Humane Primersequenzen von GAPDH, β -Actin und vWF

Primername	GenBank™-Nummer	Sequenz der Primer
hGAPDH	NM_002046	S : F 5'-CACCGTCAAAGGCTGAGAACG-3' AS : R 5'-GCCCCACTTGATTTTGGAGG-3'
hβ-Actin	NM_001100	S : F 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' AS : R 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'
hvWF	NM_000552.3	S : F 5'-AAGAAACGGGTCACCATCCT-3' AS : R 5'-GGCCTCTTCACATTCACCTC-3'

S: Sense; **AS**: Antisense

Tabelle 2.2: Humane Primersequenzen der TRPC-Unterfamilie

Primername	GenBank™-Nummer	Sequenz der Primer
hTRPC1	NM_003304.4	S : F 5'-GCCTTCCTCTCCATCCTCTT-3' AS : R 5'-ACAGCATTTCTCCCAAGCAC-3'
hTRPC2	NR_002720.1	S : F 5'-TATCCCCCGATCCCTACTTT-3' AS : R 5'-GGTAGGATCCACGCTCTCC-3'
hTRPC3	NM_001130698	S : F 5'-GCTGGCCAACATAGAGAAGG-3' AS : R 5'-TTTGTGCCTGTGTACCTCCA-3'
hTRPC4	NM_016179	S : F 5'-GGCCATTAAGTACCGTCAAAA-3' AS : R 5'-CACTGCCCAGTGTCTTCTCC-3'
hTRPC5	NM_012471.2	S : F 5'-TGATATTGCCTTGGGTTCTAG-3' AS : R 5'-GGGAGTTCATTGCAAAATCC-3'
hTRPC6	NM_004621.5	S : F 5'-ATTTACTGGTTTGCTCCARGC-3' AS : R 5'-GCAGTCCCAGAAAAATGGTG-3'
hTRPC7	NM_020389.1	S : F 5'-GGGCATGCTGAATTCCAA-3' AS : R 5'-TGGGCTTGCTCAAAGTGTTA-3'

S: Sense; **AS**: Antisense**Tabelle 2.3: Humane Primersequenzen der TRPV-Unterfamilie**

Primername	GenBank™-Nummer	Sequenz der Primer
hTRPV1	NM_080704.3	S : F 5'-AGTCACGCTGGCAACCAC-3' AS : R 5'-CGGCAGAGACTCTCCATCAC-3'
hTRPV2	NM_016113.3	S : F 5'-CCCCTGCTACTGAGAAGCTC-3' AS : R 5'-AGCTGGAGGGTGAGGTCAT-3'
hTRPV3	NM_145068.2	S : F 5'-GCCATGTGCATCTCTGTGA-3' AS : R 5'-AAAGTGGAACCAGGCATCC-3'
hTRPV4	NM_021625.3	S : F 5'-CAAGAAAGCACCATGGACT-3' AS : R 5'-CCGGTTGAAGACTTTGAGGA-3'
hTRPV5	NM_019841.4	S : F 5'-GATCGACTCCTGGGGAGAG-3' AS : R 5'-TGGGGTCTGTTCCAGAATTT-3'
hTRPV6	NM_018646.2	S : F 5'-GTTCCAGAGACGGGAGTCCT-3' AS : R 5'-GGCAGCTAGAAGGAGAGGAGA-3'

S: Sense; **AS**: Antisense

Tabelle 2.4: Humane Primersequenzen der TRM-Unterfamilie

Primername	GenBank™-Nummer	Sequenz der Primer
hTRPM1	NM_002420.4	S : F 5'-GGCAAGAAGAAAGGGAAAGTG-3' AS : R 5'-TTGCTCCAAAGCATTACACC-3'
hTRPM2	NM_003307.3	S : F 5'-CACCTGCTGGAAGGTGTAGTT-3' AS : R 5'-GCCTCTACCTGCTCTTCACC-3'
hTRPM3	NM_020952	S : F 5'-CGGACCCTCTACCACAACC-3' AS : R 5'-CTCGCCTCAAGGGAATATCA-3'
hTRPM4	NM_017636	S : F 5'-CGACCTAGTGGCTCTCACCT-3' AS : R 5'-TGAAGTCGATGCAGAGGACA-3'
hTRPM5	NM_014555	S : F 5'-CCACTGGACGAGATTGATGA-3' AS : R 5'-ACCAGCCAGTTGGCATAGAG-3'
hTRPM6	NM_017662.4	S : F 5'-TGGGCAAGTATGGAAATGAAA-3' AS : R 5'-GCACGCCTTGTCTTGAGC-3'
hTRPM7	NM_017672.3	S : F 5'-TCCCGATAGATGGCTTACAGG-3' AS : R 5'-GAGGGTCCTTGGAAGTTGGT-3'
hTRPM8	NM_024080.4	S : F 5'-CACAGACCAGCATTTTCATTCG-3' AS : R 5'-CGGGAAATCTCTCCATACCA3'

S: Sense; **AS**: Antisense

Tabelle 2.5: Humane Primersequenzen der verbliebenen TRP-Kanäle

Primername	GenBank™-Nummer	Sequenz der Primer
hTRPML1	NM_020533.1	S : F 5'-GCTGCAAGTGGTCAAGATCC-3' AS : R 5'-AAGGCGATGGTGTCTCTTC-3'
hTRPML2	NM_153259.2	S : F 5'-TGCTGGTATGATTTATCTGGG-3' AS : R 5'-CACTCAGCAACTGTGTTTCTGAG-3'
hTRPML3	NM_018298.9	S : F 5'-TTTGACATCGATCCAGAAAT-3' AS : R 5'-GGTGTCCCAATGTGAAAAGG-3'
hTRPA1	NM_007332.2	S : F 5'-CAAAATGTGCCTGGACAATG-3' AS : R 5'-TGACATCCATCGGTTGTGTT-3'
hTRPP1	NM_000297.2	S : F 5'-CTGGGGGAACAAGACTCATGG-3' AS : R 5'-ACGGGGGTGTCTAGGAAGAG-3'
hPKD2like1	NM_016112.2	S : F 5'-AGAAGAACAACCTCCCCTTTGG-3' AS : R 5'-TCCGCTGTAGCTTGTGAGC-3'

hPKD2like2	NM_014386.2	S : F 5'GGCTAGAATTGCTACTTTTGC-3' AS : R 5'-TCAACAGCTGTCCAAGTAAGA-3'
-------------------	-------------	--

S: Sense; **AS**: Antisense

2.3.4 Reduktion des Kontaminationsrisikos der RT-PCR

Da die PCR in der Lage ist, auch geringe Mengen an DNA bzw. RNA zu amplifizieren, ist sie für Kontaminationen anfällig. Besonders problematisch ist die Kontamination der PCR-Produkte durch vorausgegangene PCR-Reaktionen. Ein weiteres Problem stellt die Empfindlichkeit der mRNA dar, welche durch ubiquitär vorkommende Nukleasen der ständigen Gefahr der Degradierung unterworfen ist. Das Risiko besteht insbesondere während der Prozessierung der mRNA, d.h. Probeentnahme, Lagerung und Extraktion, und muss durch entsprechende Maßnahmen minimiert werden. Dies erfolgte bei dieser Arbeit durch das Tragen von Handschuhen, Stabilisierung der mRNA durch zügiges Umschreiben in die stabilere cDNA sowie Dekontaminierungsmaßnahmen im Labor. Zudem erfolgte die Vorbereitung der RT-PCR, d.h. das Pipettieren des Master Mix und der PCR-Platte, an einem separaten Arbeitsplatz, der nur für solche Zwecke verwendet wurde. Alle in diesen Arbeitsbereich gebrachten Materialien wurden zur Zerstörung eventuell vorhandener Nukleinsäuren mit einer 70%igen Alkohollösung äußerlich abgewischt. Auch wurde die Arbeitsplatte vor jeder neuen RT-PCR mit Alkohollösung gereinigt. Die Dekontamination sämtlich verwendeter Arbeitsflächen und Geräte erfolgte in regelmäßigen Abständen. Zum Pipettieren wurden nukleinsäurefreie gestopfte Pipetten verwendet. Alle Gefäße mit Reagenzien und Proben wurden vor der Verwendung abzentrifugiert. Zudem erfolgte die Analyse der Amplifikate an einem getrennten Arbeitsplatz.

2.3.5 Auswertung der *Real Time*-PCR

Es stehen mehrere Möglichkeiten zur Quantifizierung der PCR-Produkte zur Verfügung. Eine davon ist die Verwendung interkalierender DNA-Farbstoffe, zu denen auch SYBR Green I gehört. Wenn SYBR Green I an die kleine Furche doppelsträngige DNA bindet, erhöht sich die Intensität der Fluoreszenzemission. Die Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes mit der cDNA während der Elongation ermöglicht die qualitative und semiquantitative Bestimmung der mRNA-Expression. Nach Anregung durch energiereiches UV-Licht emittiert der Farbstoff grünes Licht. Hierbei nimmt die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes proportional zu der Menge der PCR-Produkte zu. Durch Wiederholung des Reaktionszyklus entsteht eine exponentielle Amplifikation des DNA-Fragments, wodurch am Ende eines Laufs anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen werden kann. Nur in der exponentiellen Phase der PCR, deren Dauer wenige Zyklen eines Laufs beträgt, ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Der Nachweis der Amplikonbildung

erfolgt hierbei in jedem PCR-Zyklus und somit in Echtzeit („*real time*“). Die Menge dieses Amplifikation wird durch den Verbrauch der Substrate (dNTPs, Oligonukleotiden sowie Taq-Polymerase) limitiert. Ein Nachteil bei der Verwendung von SYBR Green I ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff an jegliche doppelsträngige DNA bindet und nicht spezifisch für die Primerprodukte ist.

Mittels der ABI PRISM®-7500-System-SDS-Software wurde der Schwellen-Ct-Wert (*cycle of threshold* = Schwellenzyklus) für jede Reaktion ermittelt. Die vergleichende $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ermöglichte eine semiquantitative Auswertung der Ergebnisse. Der Schwellen-Ct-Wert stellt den Anfangspunkt der exponentiellen Phase der sequenzspezifischen PCR-Reaktion dar, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Für jede Probe wurde zudem die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase als sogenanntes *housekeeping*-Gen bestimmt. Die Expression der GAPDH erwies sich als unabhängig von der Wirkung der eingesetzten pro-angiogenetischen bzw. vasoaktiven Faktoren. Daher eignet sich GAPDH als interner Standard für die semiquantitative Erfassung der Expression des zu untersuchenden Gens. Demnach wurde zur relativen Quantifizierung der entsprechenden Genexpression die Differenz zwischen dem Ct-Wert eines beliebigen Gens und dem Ct-Wert der GAPDH derselben Probe berechnet:

$$\text{Ct}_{\text{Gen}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}} = \Delta\text{Ct}$$

Zur Feststellung der veränderten Genexpression unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren bzw. vasoaktiven Substanzen wurden im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollen die entsprechenden $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Stimulation/Inhibition}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}} = \Delta\Delta\text{Ct}$$

2.3.6 Linearitätsanalysen

Zur Durchführung der Linearitätsanalyse wurde die cDNA wie folgt verdünnt: zunächst wurde aus einem PCR-Tube mit 20 μL cDNA 1 μL abpipettiert und mit 9 μL Aqua ad injectabile verdünnt. So entstand die 1:10 Verdünnung. Für den nächsten Verdünnungsschritt wurde aus der 1:10 Verdünnung 1 μL entnommen und erneut mit 9 μL Aqua ad injectabile gründlich vermischt, woraus die 1:100 Verdünnung entstand. Für den letzten Verdünnungsschritt, die 1:1000 Verdünnung, erfolgt die Entnahme von 1 μL der 1:100 Verdünnung, welcher zu 9 μL Aqua ad injectabile pipettiert wurde. Anschließend wurde von den verdünnten Proben ein Ansatz der RT-PCR mit Negativkontrolle von jedem Primer durchgeführt, um zu zeigen, dass die Primerlösungen nicht verunreinigt waren.

2.3.7 Gelelektrophorese

Um die Fragmente der cDNA aufzutrennen und sichtbar zu machen sowie als definitive Kontrolle, dass keine Kontamination erfolgt war, wurde im Anschluss an die qualitative und semiquantitative RT-PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 2%iges Agarosegel wie folgt hergestellt: Zunächst wurden 1,2g Agarose in 60mL des Elektrophoresepuffers mittels Aufkochen von etwa 2 Minuten und vorsichtigem Schwenkens aufgelöst. Der für die Elektrophorese verwendete Puffer war der TAE-Puffer, bestehend aus 0,2M Triethanolamin, 1mM Magnesiumsulfat MgSO_4 , 1mM EDTA, 0,01% Azide bei einem pH von 7,4. Nachdem die Agaroselösung leicht abgekühlt war, wurden 4 μL Ethidiumbromid hinzupipettiert und vermischt. Anschließend wurde die Gellösung in die dafür vorbereitete Gießform des Flachbettgels gefüllt. Nach Erstarren des Gels konnten die Kämme entfernt werden und die Elektrophoresekammer mit dem Elektrophoresepuffer so gefüllt werden, dass der Flüssigkeitsspiegel wenig oberhalb des Gels lag.

Nun erfolgte das Vorbereiten der RT-PCR-Proben. Dazu wurden zu den 20 μL in jedes Well der TaqManTM-Platte 5 μL Gel-Loading-Buffer pipettiert und gründlich vermischt. Von dieser Lösung wurden 10 μL in die Taschen des Gels gegeben. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurden 5 μL einer Standard-DNA-Leiter in eine Tasche eingefüllt. Auch hier gab es eine Negativkontrolle, bei der anstatt einer TaqManTM-Probe Wasser mit dem Gel-Loading-Buffer versetzt wurde. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele auf einen UV-Transluminator gelegt. Da Ethidiumbromid bei einer Wellenlänge von 302nm fluoresziert, konnten die DNA-Fragmente, mit denen Ethidiumbromid interkaliert war, so sichtbar gemacht werden.

2.4 Stimulationsuntersuchungen *in vitro*

Um zum einen das Zellwachstum zu stagnieren, aber auch um das Überleben der Zellen zu ermöglichen, wurden die HMEC-1 zunächst für 24h auf ein Mangelmedium gesetzt. Dafür wurde das Standardmedium durch eines ersetzt, welches anstatt der 10% FCS lediglich 200 μL FCS auf 500mL Medium enthielt. Die weitere Zusammensetzung des Mediums entsprach der des oben erwähnten Standardmediums. Zu den zu stimulierenden Petrischalen mit HMEC-1 wurden je entsprechende Mengen an der entsprechenden vasoaktiven (Histamin, Bradykinin und Endothelin-1) bzw. pro-angiogenetischen (Erythropoetin und VEGF121) Faktoren gegeben. Dabei wurden die Lösungen wie folgt mit den entsprechenden Endkonzentrationen hergestellt: VEGF mit 50 ng/ml (Gerber et al. 1998), Erythropoetin mit 200IE, Histamin 10 μM (Tan et al. 2007), Bradykinin mit 0,1 μM (Yong et al. 2003) und Endothelin-1 mit 0,1 μM .

Zur Kontrolle der Wirkung dieser Faktoren wurde zusätzlich noch zu jeder Petrischale mit stimulierten Zellen eine Negativkontrolle gemacht. Bei dieser erfolgt lediglich der Wechsel des Standardmediums auf das Mangelmedium. Nachdem die HMEC-1 für 4 Stunden mit den entsprechenden vasoaktiven bzw. pro-angiogenetischen Faktoren stimuliert worden waren, erfolgte die Extraktion der cDNA sowohl der stimulierten Zellen als auch der Negativkontrolle. In den folgenden Abbildungen 2.2 bis 2.6 sind schematisch die Strukturen, welche zum Stimulieren der HMEC-1 verwendet wurden, dargestellt.

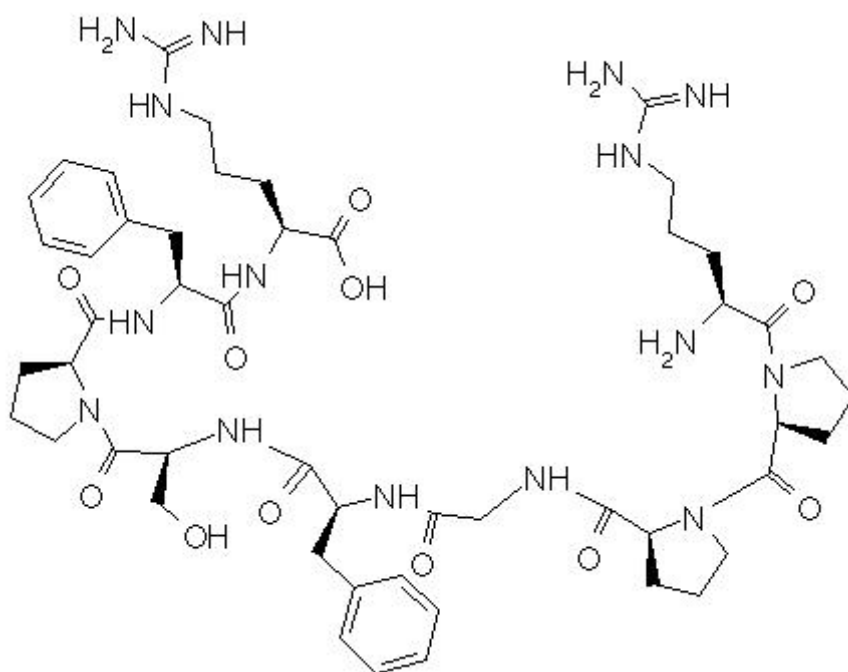


Abb. 2.2: Die Strukturformel von Bradykinin.

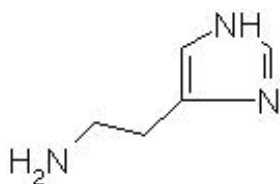


Abb. 2.3: Die Strukturformel von Histamin

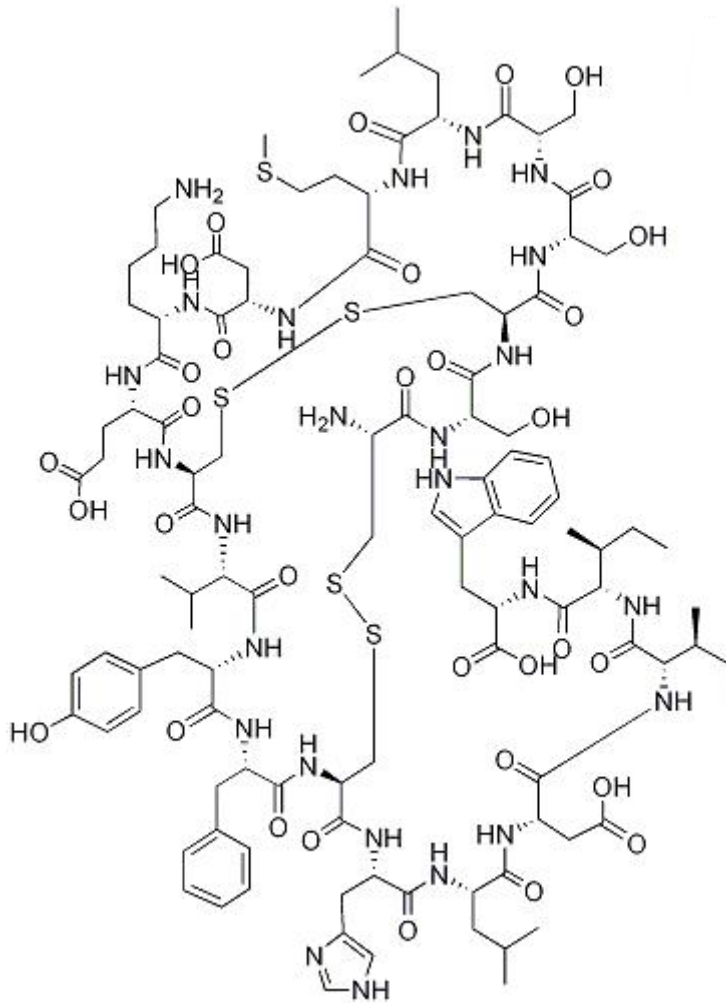


Abb. 2.4: Die Strukturformel von Endothelin-1

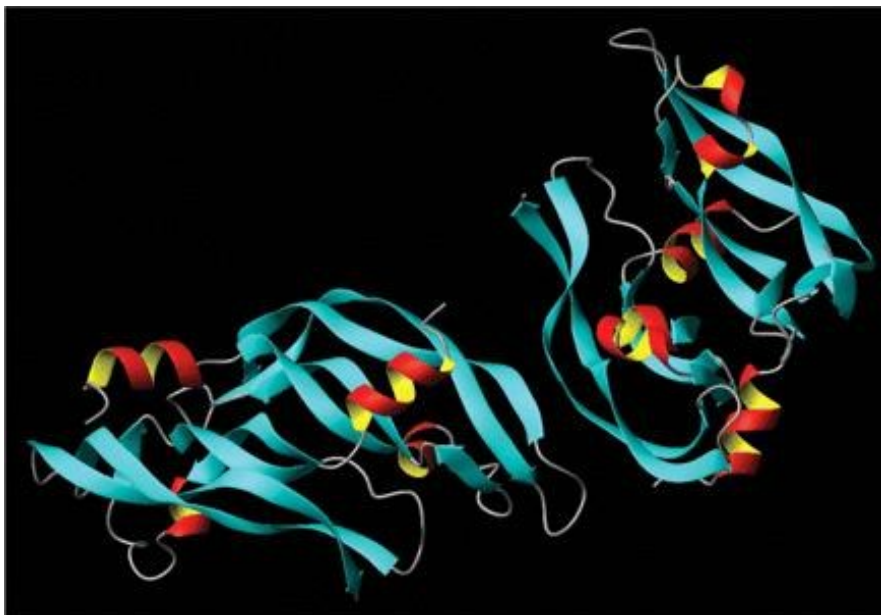


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Struktur von humanem VEGF

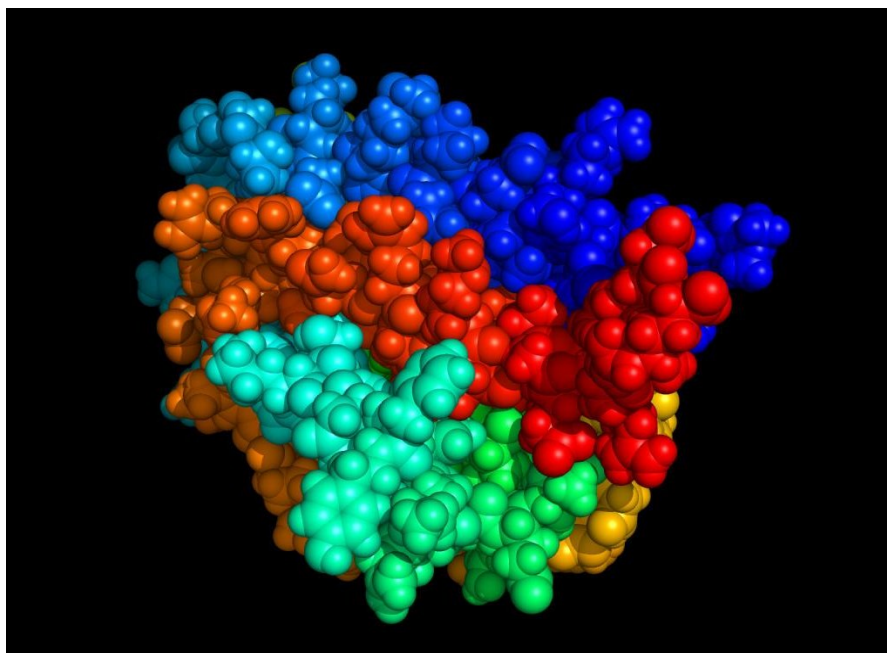


Abb. 2.6: Schematischer Aufbau von Erythropoetin

2.5 Statistische Analyse

Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SE) angegeben. Die mittleren ΔC_t -Werte der verschiedenen Experimentgruppen wurden mit den gepaarten t-Tests verglichen sowie P-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen; ein P-Wert $<0,01$ gilt als hoch signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung zur Expression von TRP-Kanälen in HMEC-1

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in der systematischen Untersuchung aller Mitglieder der humanen TRP-Familie in mikrovaskulären Endothelzellen des Menschen (*human dermal microvascular endothelial cells*, HMEC-1). Dazu wurde die basale Expression der TRP-Transkripte in nicht stimulierten HMEC-1 sowohl qualitativ als auch semi-quantitativ mittels der Methode der *real time* RT-PCR erfasst. Die dabei verwendeten genspezifischen Primersequenzen wurden mittels der *Primer Express Software* erstellt. Dabei entsprachen die humanen TRP-Sequenzen den in GenBank® publizierten Daten. Die daraus folgenden Ergebnisse werden in den Unterkapiteln **3.1.1** bis **3.1.4** darstellt. Es ist unwahrscheinlich, dass die PCR-Produkte von Verunreinigungen mit genomischer DNA stammen, da bekannt ist, dass es bei *forward* und *reverse* Primern, die auf unterschiedlichen Exons liegen, nicht zu Verunreinigung mit genomischer DNA kommen kann. Grund hierfür ist, dass die PCR-Amplifikation genomischer DNA zu größeren Produkten führen würde (4-19kb). Liegen beide Primer auf demselben Exon, erkennt man die Verunreinigung mit genomischer DNA nicht (Yip et al. 2004).

Für jede Probe wurde, neben der Untersuchung der TRP-Kanäle, zudem die Expression der humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) als sogenanntes *house-keeping*-Gen bestimmt. Die Expression der GAPDH erweist sich als unabhängig von der Wirkung pro-angiogenetischer bzw. vasoaktiver Faktoren. Daher eignete sich GAPDH als interner Standard für die semi-quantitative Erfassung der Expression des zu untersuchenden Gens. Als spezifischer Marker für Endothelzellen wurde der von-Willebrand-Faktor (vWF) verwendet. Da dieser ubiquitär von Endothelzellen exprimiert wird, wird vWF routinemäßig verwendet, um Gewebe als Endothel zu identifizieren.

Um eine ausreichend große Stichprobe für eine statistisch signifikante Aussage zu haben, wurde jeder Versuch drei Mal wiederholt. Die in den Versuchen gewonnenen Mittelwerte RT-PCR Zyklen der entsprechender humanen TRP-Kanäle werden in den folgenden Graphiken gegen hGAPDH normalisiert dargestellt. Zur besseren Darstellung wurden die normalisierten Werte logarithmiert:

$$\log 1/2^{(\text{Ct-Wert TRP-Kanal} - \text{Ct-Wert GAPDH})}$$

Zudem werden die zugehörigen Gelelektrophoresen der durchgeführten TaqMan®-PCR incl. *non-template control* (ntc) gezeigt.

3.1.1 Expression der mRNA von hTRPC in HMEC-1

Von den sieben Mitgliedern der hTRPC-Familie konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden, dass in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) die folgenden fünf TRPC-Transkripte exprimiert werden: hTRPC1, hTRPC3, hTRPC4, hTRPC6 sowie hTRPC7. Dabei amplifizierte die RT-PCR die erwarteten Produkte von 207bp für hTRPC1, 174bp für hTRPC3, 112bp für hTRPC4, 103bp für hTRPC6 sowie 95bp für hTRPC7 aus der aus HMEC-1 isolierten mRNA (Abbildungen 3.1 a-b). Die Expression von TRPC1, TRPC4 und TRPC6 erwies sich als besonders hoch. Hingegen konnte die Expression von TRPC2 nicht nachgewiesen werden. Grund hierfür ist, dass TRPC2 im humanen Genom ein Pseudogen kodiert und lediglich in einer sehr begrenzten Zahl von Geweben nachgewiesen werden konnte. Ein Pseudogen stellt einen DNA-Abschnitt dar, der zwar wie ein Gen aufgebaut ist, jedoch kein funktionelles Protein kodiert. Ebenfalls konnte keine Expression des 117bp großen Transkripts von hTRPC5 in humanen Endothelzellen vom Typ HMEC-1 gezeigt werden. In Abbildung 3.1a-b werden die Expression der in HMEC-1 festgestellte TRPC-Kanäle (n= 3) sowie die entsprechenden Gele dargestellt.

Des Weiteren wird die Expression des endothelsepezifischen Proteins von-Willebrand-Faktor vWF gezeigt, womit nachgewiesen werden konnte, dass die sich in Kultur befindlichen HMEC-1 weiterhin ihre Endothel-spezifischen Eigenschaften beibehalten haben.

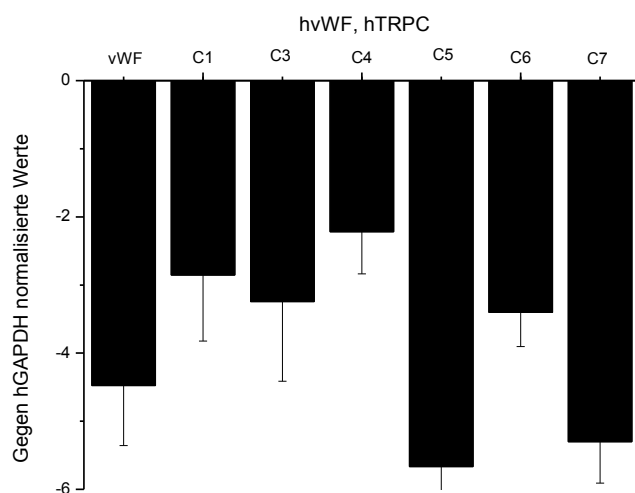
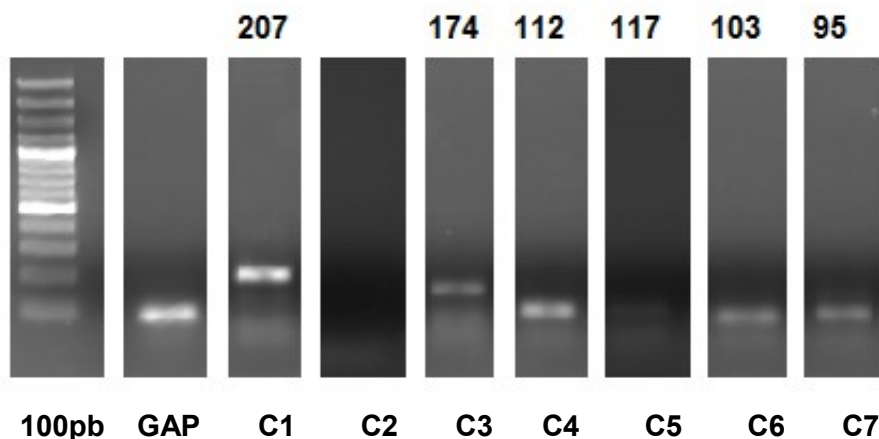


Abb. 3.1a: Expressionshöhe der mRNA von hGAPDH, hvWF und hTRPC in HMEC-1 (ermittelt durch die semi-quantitative Real-time RT-PCR, n = 3). hGAPDH diene als *house-keeping gene*. Darstellung der gegen hGAPDH normalisierten Mittelwerte der RT-PCR-Zyklen der entsprechenden TRP-Kanäle.

A



B

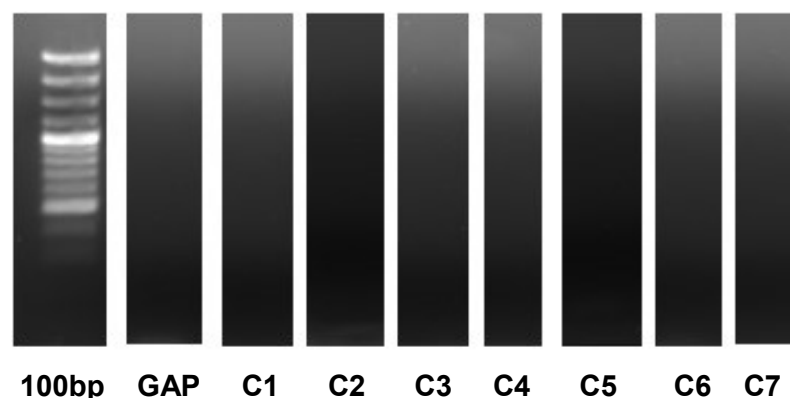


Abb. 3.1b: Agarose-Gelelektrophorese von hGAPDH und hTRPC in HMEC-1 (ermittelt durch die semi-quantitative Real-time RT-PCR). A: Die PCR-Produkte der RT-PCR (10µL/Reihe) von hTRPC1, hTRPC2, hTRPC3, hTRPC4, hTRPC5, hTRPC6 und hTRPC7 wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Markierung mit Ethidiumbromid visualisiert. Leiter mit 100bp. B: ntc der PCR-Produkte aus der entsprechenden RT-PCR.

3.1.2 Expression der mRNA von hTRPV in HMEC-1

Bei der Untersuchung der Expression von Transkripten der hTRPV-Familie konnte die Expression von hTRPV1 mit 102bp, hTRPV2 mit 188bp und hTRPV4 mit 157bp in HMEC-1 (n = 3) gezeigt werden (Abbildung 3.2a-b). Zusätzlich werden in dieser Abbildung auch die gelelektrophoretischen Bilder dargestellt. Bei der Expression von hTRPV4 zeigten sich zudem teils mehrere Banden gelelektrophoretisch. Hierbei ist von Splice-Varianten auszugehen, die bei TRPV4 regelhaft beschrieben worden sind. Aufgrund der sehr geringen Expression der RT-PCR ist das Vorkommen der 91bp für hTRPV5 unwahrscheinlich. Bei dem Versuch mittels *real-time*-RT-PCR die erwarteten PCR-Produkte von 93 bp für hTRPV3 und von 95bp für hTRPV6 nachzuweisen, zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse. Dies bedeutet, dass in der Gelelektrophorese zusätzliche unspezifische Banden dargestellt werden konnten, womit diese Daten, aufgrund ihrer Widersprüchlichkeit nicht zu bewerten waren.

Ergebnisse

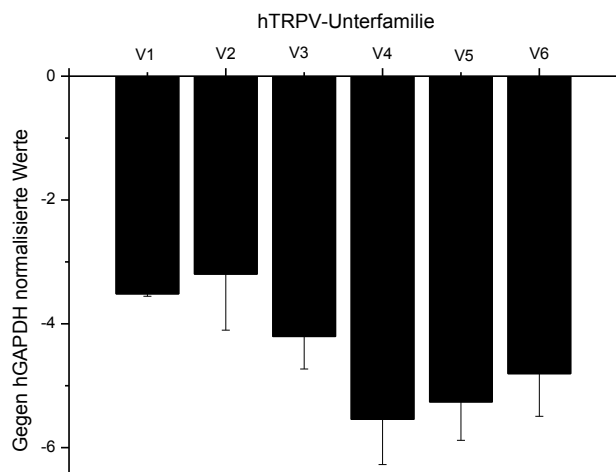


Abb. 3.2a: Expressionshöhe der mRNA von hTRPV in HMEC-1 (ermittelt durch die semi-quantitative Real-time RT-PCR, n = 3). hGAPDH diente als *house-keeping gene*. Darstellung der gegen hGAPDH normalisierten RT-PCR-Zyklen der entsprechenden TRP-Kanäle.

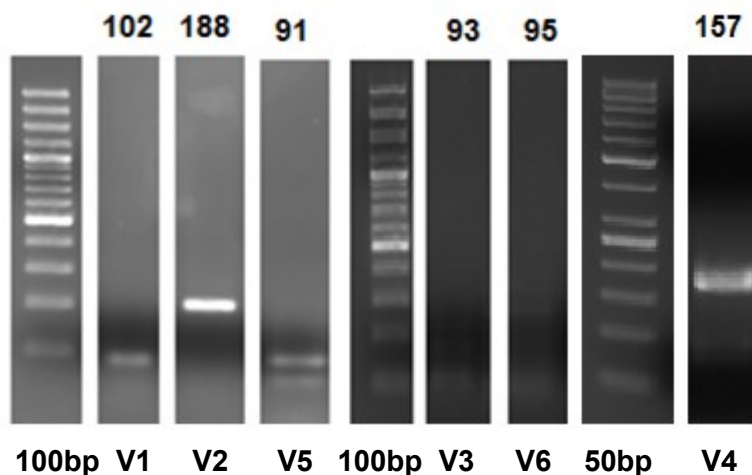
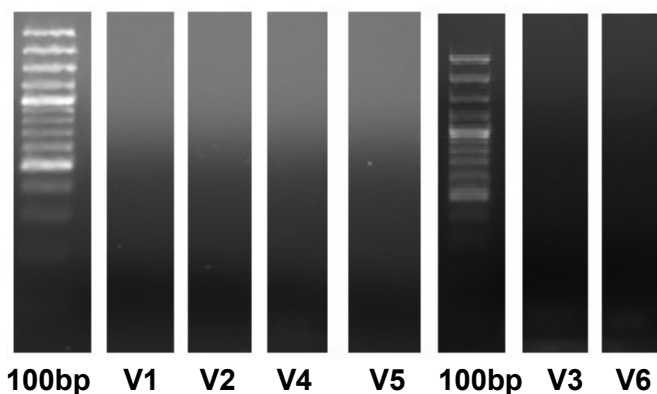
A**B**

Abb. 3.2b: Agarose-Gelelektrophorese von hTRPV in HMEC-1 (ermittelt durch die semi-quantitative Real-time RT-PCR). *A:* Die PCR-Produkte der RT-PCR (10µL/Reihe) von hTRPV1, hTRPV2, hTRPV3, hTRPV4, hTRPV5 und hTRPV6 wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Markierung mit Ethidiumbromid visualisiert. Leiter mit 100bp bzw. mit 50bp. *B:* ntc der PCR-Produkte aus der entsprechenden RT-PCR.

3.1.3 Expression der mRNA von hTRPM in HMEC-1

Von den acht Mitgliedern der hTRPM-Familie konnte, mittels RT-PCR, die Expression folgender Produkte nachgewiesen werden: 98bp für hTRPM4, 101bp für hTRPM5, 93bp für hTRPM6, 156bp für hTRPM7 sowie 75bp für hTRPM8 ($n = 3$). Die letzteren drei Transkripte, d.h. hTRPM6, hTRPM7 und hTRPM8, wurden verglichen mit den Daten der übrigen Transkripte deutlich stärker exprimiert. Diese Daten und die entsprechenden Gele für die PCR-Produkte werden in Abbildung 3. 3a-b dargestellt.

Die Daten der zu erwarteten RT-PCR Produkte von 93bp für hTRPM1, von 78bp für hTRPM2 sowie von 89bp für hTRPM3 zeigten teilweise, trotz hoher Expression insbesondere von hTRPM2, unspezifische Banden in der nachfolgenden Ethidiumbromid-markierten Gel-Elektrophorese.

Ergebnisse

Aufgrund dessen waren die Ergebnis der drei ersten Mitglieder der humanen TRPM-Familie nicht auszuwerten.

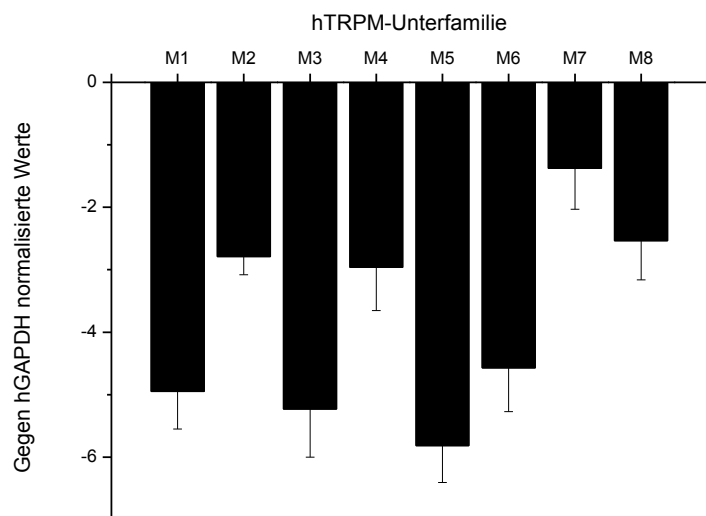


Abb. 3.3a: Expressionshöhe der mRNA von hTRPM in HMEC-1 (ermittelt durch die semi-quantitative Real-time RT-PCR, n = 3). hGAPDH diente als *house-keeping gene*. Darstellung der gegen hGAPDH normalisierten RT-PCR-Zyklen der entsprechenden TRP-Kanäle.

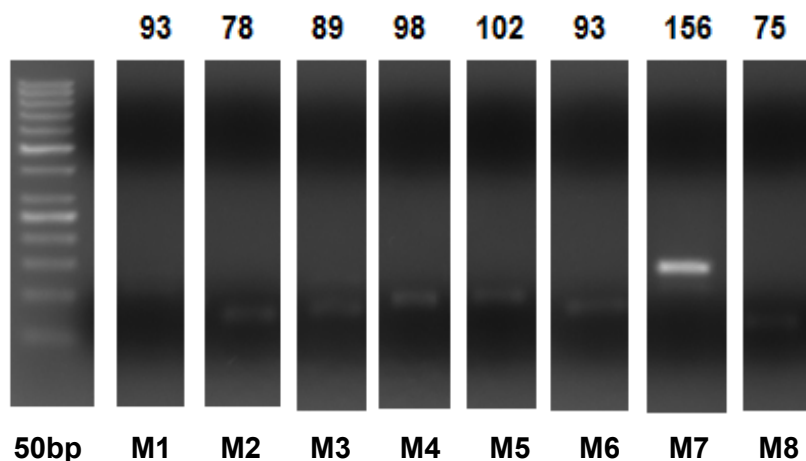
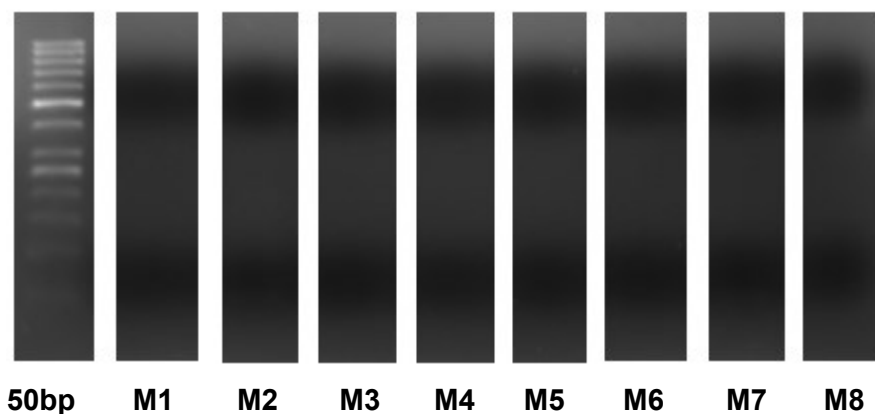
A**B**

Abb. 3.3b: Agarose-Gelelektrophorese von hTRPM in HMEC-1 (ermittelt durch die semi-quantitative Real-time RT-PCR). *A:* Die PCR-Produkte der RT-PCR (10µL/Reihe) von hTRPM1, hTRPM2, hTRPM3, hTRPM4, hTRPM5, hTRPM6, hTRPM7 und hTRPM8 wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Markierung mit Ethidiumbromid visualisiert. Leiter mit 50bp. *B:* ntc der PCR-Produkte aus der entsprechenden RT-PCR.

3.1.4 Expression von hTRPML, hTRPA1, hTPP1, hPKD2like in HMEC-1

Die letzten Mitglieder der humanen hTRP-Familie zeigten unterschiedliche Daten bezüglich ihrer Expression in HMEC-1. Dabei konnte die Expression von hTRPA1 mit 162bp und hTRPML2 mit 96bp in HMEC-1 nachgewiesen werden, wenn auch lediglich sehr schwach. Bei dem 102bp großen hTRPML1 und dem 75bp großen TRPML3 zeigte sich zwar eine starke Expression. Bei der nachfolgenden Gelelektrophorese waren jedoch teils unspezifische Banden detektierbar. Des Weiteren konnte eine starke Expression von hTRPP1 mit 186bp in HMEC-1 gezeigt werden. Das qualitative Vorkommen von hPKD2like1 mit 109bp konnte zwar in HMEC-1 nachgewiesen werden, zeigte aber eine schwache Expression. Aufgrund der nur sehr geringen Expression des RT-PCR-Produktes von hPKD2like2 mit 96bp ist das Vorhandensein dieses humanen TRP-Kanals in HMEC-1 eher

Ergebnisse

unwahrscheinlich. In Abbildung 3.4a-b werden die Ergebnisse für TRPA1, TRPML1, ML2, ML3, TRPP1 sowie PKD2like1 und PKD2like2 dargestellt. Jeder Versuch wurde drei Mal durchgeführt.

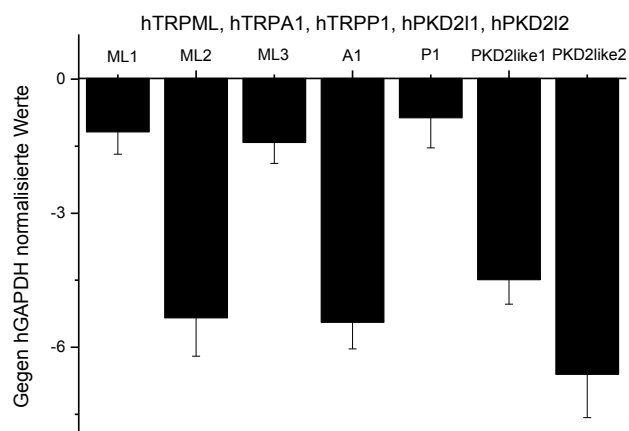


Abb. 3.4a: Expressionshöhe der mRNA von hTRPML, hTRPA und hTRPP in HMEC-1 (ermittelt durch die semi-quantitative Real-time RT-PCR, n = 3). hGAPDH diene als *house-keeping gene*. Darstellung der gegen hGAPDH normalisierten RT-PCR-Zyklen der entsprechenden TRP-Kanäle.

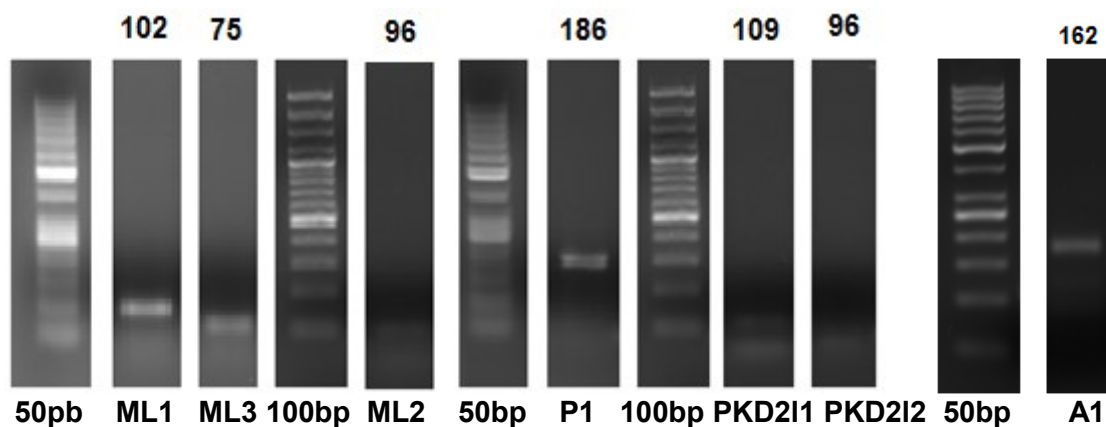
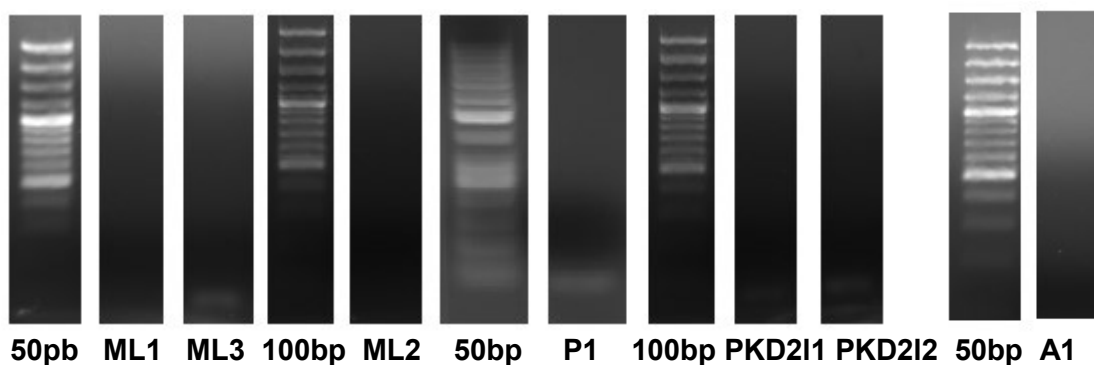
A**B**

Abb. 3.4b: Agarose-Gelelektrophorese von hTRPML, hTRPA und hTRPP in HMEC-1 (ermittelt durch die semi-quantitative Real-time RT-PCR). *A:* Die PCR-Produkte der RT-PCR (10 μ L/Reihe) von hTRPML1, hTRPML2, hTRPML3, hTRPA1, hTRPP1 und hPKD2like1 und hPKDlike2 wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Markierung mit Ethidiumbromid visualisiert. Leiter mit 100bp und 50bp. *B:* Die PCR-Produkte der RT-PCR (10 μ L/Reihe) der ntc.

3.2 Linearitätsanalysen

Um die Linearität der *real time* RT-PCR zu untersuchen, wurden die ΔC_t -Werte der Zielgene gegen die Verdünnung der cDNA aufgetragen. Wenn die Steigung der Geraden nahe Null (0) liegt, sind die Effizienten des *house-keeping*-Gens hGAPDH und des Zielgens gleich. Dann ist es möglich, die $\Delta\Delta C_t$ -Methode zur Auswertung anzuwenden. Bei der Durchführung der Linearitätsanalyse wurde die cDNA in verschiedenen Konzentrationen verdünnt: 1:1, 1:10, 1:100 sowie 1:1000. Anschließend erfolgte eine RT-PCR.

In den nachfolgenden Tabellen 3.1.1 bis 3.1.4 sind der angepasste R-Wert und die Steigung angezeigt. Der R-Wert steht für die Güte der non-linearen Regressionsanalyse und sollte gegen eins (1) gehen.

Ergebnisse

Die Steigung der Geraden sollte nahe Null (0) liegen. Die abgebildeten Steigungen erfüllen diese Voraussetzung, so dass die Durchführung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode zur Auswertung ermöglicht wird. Wenn lediglich bei dem unverdünnten Wert der cDNA die Expression eines TRP-Kanals gemessen werden konnte, war es nicht möglich, eine Regression durchzuführen. Das heißt der R-Wert ist automatisch 0, ebenso wie die Steigung.

Tabelle 3.1: Regression und Steigung der hTRP-Kanäle

Tabelle 3.1.1: Regression und Steigung von hGAPDH, h β -Aktin, hvWF und hTRPC

Zielgen	Angepasster R-Wert	Steigung
GAPDH	0,94521	0,43535
β -Aktin	0,98554	0,17111
vwf	0,99066	0,08743
TRPC1	0,95143	0,20506
TRPC2	0,95814	0,27009
TRPC3	0,93892	0,55387
TRPC4	0,9965	0,05472
TRPC5	0,98579	0,09004
TRPC6	0,98503	0,16563
TRPC7	0	0

Tabelle 3.1.2: Regression und Steigung von hTRPV

Zielgen	Angepasster R-Wert	Steigung
TRPV1	0,98108	0,05171
TRPV2	0,97498	0,19419
TRPV3	0,96463	0,08788
TRPV4	0	0
TRPV5	0	0
TRPV6	0,98207	0,03377

Tabelle 3.1.3: Regression und Steigung von hTRPM

Zielgen	Angepasster R-Wert	Steigung
TRPM1	0,97911	0,35043
TRPM2	0,97217	0,3742
TRPM3	0,98301	0,12098
TRPM4	0,97324	0,23089
TRPM5	0	0
TRPM6	0,98351	0,08957
TRPM7	0,99773	0,02977
TRPM8	1	1,66667E-5

Tabelle 3.1.4: Regression und Steigung von hTRPA1, hTRPML und hTRPP

Zielgen	Angepasster R-Wert	Steigung
TRPA1	0,99842	0,00707
TRPML1	0,99721	0,04847
TRPML2	0	0
TRPML3	0,97069	0,38313
TRPP1	0,95093	0,55799
PKD2like1	0,97239	0,3808
PKD2lik2	0,94565	0,78482

In der folgenden Abbildung **3.5** sind graphisch die Ergebnisse der mittels non-linearer Regression gewonnenen Daten der Steigung aus den Linearitätsanalysen aller 28 humanen Mitglieder der TRP-Familie dargestellt. Sind weniger als vier Punkte, entsprechend den vier Konzentrationen der cDNA, in den Abbildungen zu sehen, war die Menge der mRNA dieser Kanäle in HMEC-1 so gering, dass die *Taqman® Software* keine Daten liefern konnte. Dies zeigt sich auch an dem Fehlen verdünnter Werte. Aufgrund des geringen Vorkommens von TRPC7 und TRPM5 in HMEC-1, wie auch die Daten der mRNA-Expression bereits ergeben haben, lieferte bei diesen TRP-Kanälen lediglich der unverdünnte Wert ein Ergebnis.

Ergebnisse

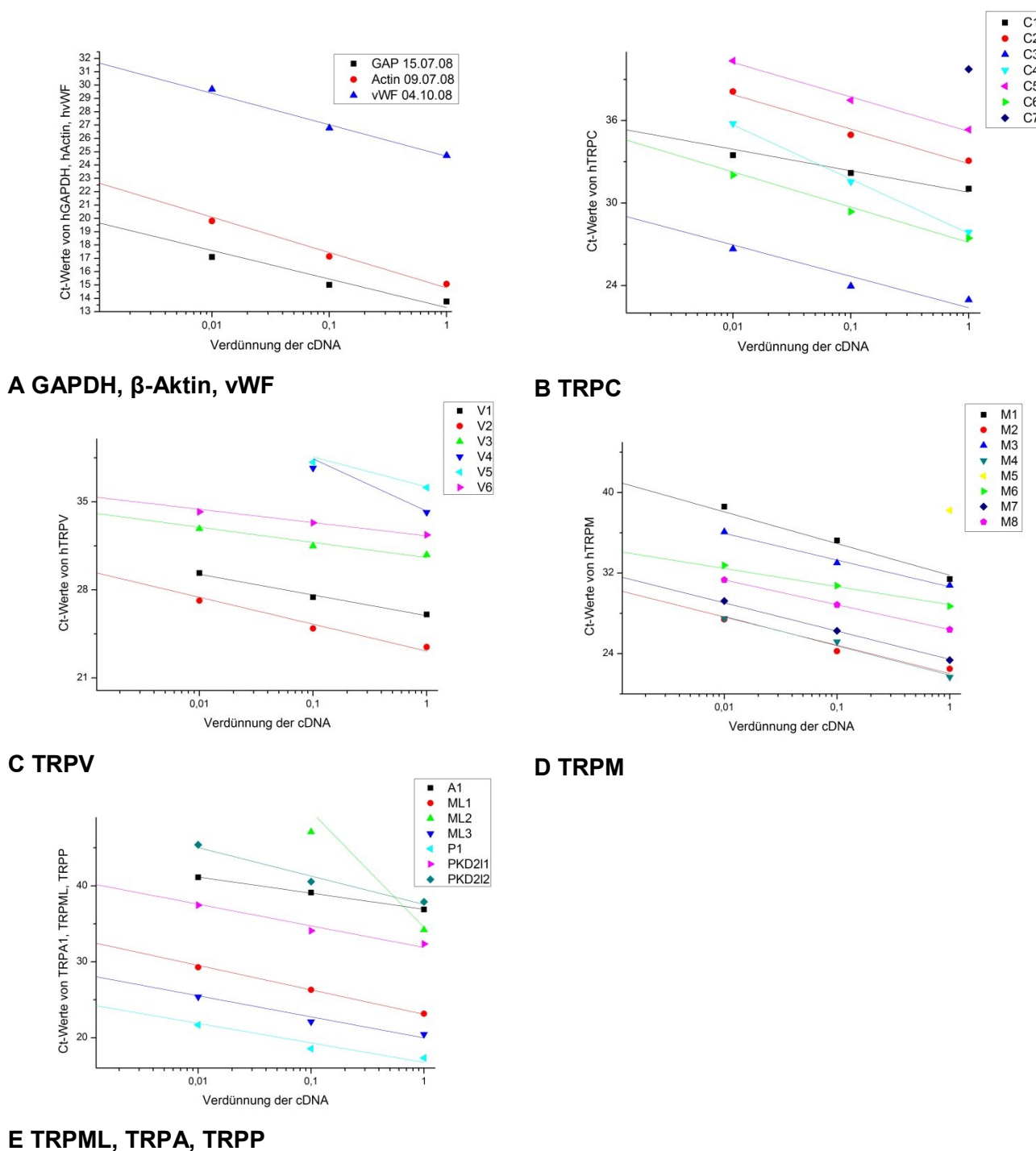


Abb. 3.5: Linearitätsanalyse von GAPDH, β -Aktin, vWF und TRP-Kanälen in HMEC-1. Darstellung der Steigung der Geraden der Effizienzen des *house-keeping*-Gen hGAPDH und der entsprechenden Zielgene mittels non-linearer Regression. Dies ermöglicht die Durchführung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode zur Auswertung der Daten. A: GAPDH, β -Aktin, vWF. B TRPC1, 2, 4, 6, 7. C: TRPV2, 3, 4. D: TRPM2, 3, 5, 7, 8. E: TRPML3, TRPP1. Verdünnungsreihen der cDNA von 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000.

3.3 Veränderungen der mRNA-Expression von TRP-Kanälen in stimulierten HMEC-1

Um die weitreichenden physiologischen Funktionen von TRP-Kanälen zu verstehen, ist es erforderlich, die allgemeinen Aspekte ihrer Regulation und Modulation zu verstehen. Mittels semi-quantitativer *real time*-RT-PCR wurde untersucht, ob sich nach Stimulation der HMEC-1 mit verschiedenen Faktoren eine veränderte Expression der TRP-Produkte aufzeigen ließ. Dazu wurden als pro-angiogenetische Faktoren der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und Erythropoetin verwendet. Zur Stimulation der HMEC-1 mit vasoaktiven Substanzen dienten Histamin, Endothelin-1 und Bradykinin. Die Zellen wurden, nachdem sie 24 Stunden auf Mangelmedium gewachsen waren, für eine Dauer von 4 Stunden jeweils mit den entsprechenden Faktoren stimuliert. Grund des Umsetzens der HMEC-1 auf Mangelmedium war es, den Wachstumsreiz von FCS (*fetal calf serum*) im Wachstumsmedium auf die Endothelzellen zu reduzieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse mit den verschiedenen Substanzen dargestellt. Die in den Versuchen gewonnenen ΔCt -Werte werden in den folgenden Graphiken dargestellt. Zudem werden die zugehörigen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte und die entsprechenden RT-Gelelektrophoresen gezeigt.

3.3.1 Stimulation der HMEC-1 mit vasoaktiven Faktoren

Vasoaktive Substanzen, zu denen sowohl relaxierende, wie Bradykinin und Acetylcholin, als auch konstringierende, wie Endothelin-1 und Angiotensin II gehören, werden aus Zellen des Gefäßsystems freigesetzt oder zirkulieren im Blut. Sie binden an ihre Rezeptoren, meist GPCRs oder Rezeptor-Tyrosinkinasen, und beschleunigen dadurch die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Durch Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wiederum werden die Endothelzellen zu unterschiedlichen Prozessen stimuliert, u.a. dazu eine Vielzahl von vasoaktiven Substanzen zu generieren. Da viele TRP-Kanäle für Ca^{2+} permeabel sind und dadurch zu oben genannt Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beitragen, wurde untersucht, ob und inwieweit ein Einfluss bestimmter vasoaktiver Faktoren auf die Höhe der Expression von TRP-Kanälen besteht.

In den folgenden Abbildungen 3.6 bis 3.10 werden jeweils Balkendiagramm mit entsprechender Grafik für die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte sowie das entsprechende gelelektrophoretische Bild dargestellt. Es werden nur die Daten der 28 Mitglieder der humanen TRP-Familie dargestellt, deren Expression in HMEC-1 in dieser Arbeit, wie oben bereits erläutert, gezeigt werden konnte.

Bradykinin

Die Wirkung von Bradykinin erfolgt über GPCRs. Obwohl die basale Freisetzung von NO ein von Ca^{2+} unabhängiger Prozess ist, stimuliert die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die eNOS, wodurch es zu einer

Ergebnisse

stärkeren Produktion und Freisetzung von NO aus Endothelzellen kommt. Durch Aktivierung von Kinin-Rezeptoren, insbesondere dem Bradykinin-2-Rezeptor, kommt es zu einer, durch Bradykinin vermittelten, Vasodilatation durch Stimulierung der Freisetzung von NO, PGI₂ sowie EDHF aus dem Endothel. Daher wurde die Wirkung einer Stimulation von HMEC-1 mit Bradykinin auf die Expression der TRP-Kanäle untersucht (Abbildung 3.6a-c). Zur Datenerhebung erfolgten sieben Versuche mit HMEC-1, welche mit Bradykinin stimuliert worden waren, sowie fünf Kontrollversuche. Hierbei konnten signifikante Ergebnisse für TRPM4, TRPM5 und TRPM8 (*, $p < 0,05$) aufgezeigt werden.

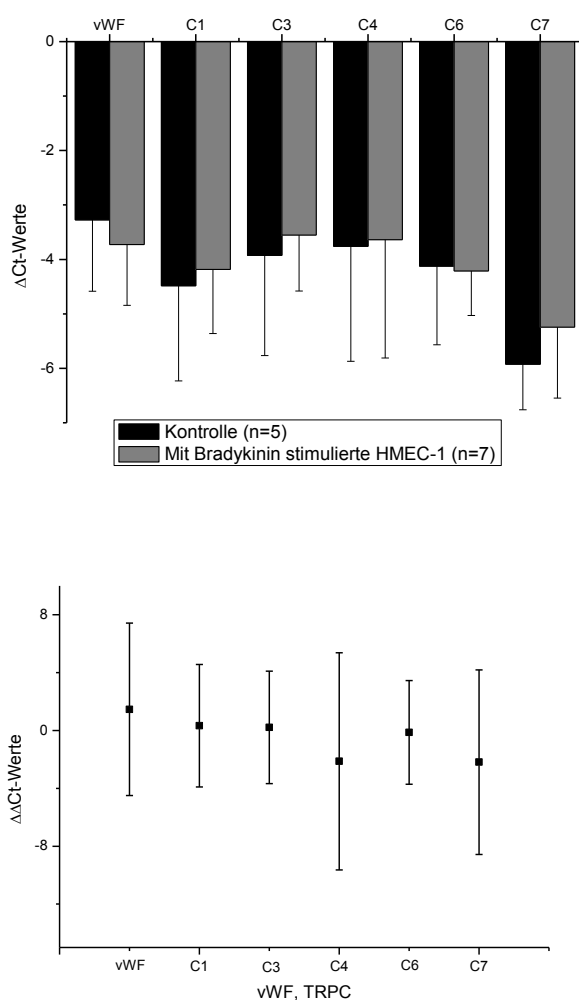


Abb. 3.6a: vWF, TRPC1/3/4/6/7 nach Stimulation mit Bradykinin (Brady). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 0,1 μ M Bradykinin stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnissen ($p < 0,05$). Darstellung der Δ Ct-Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta$ Ct-Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle.

Ergebnisse

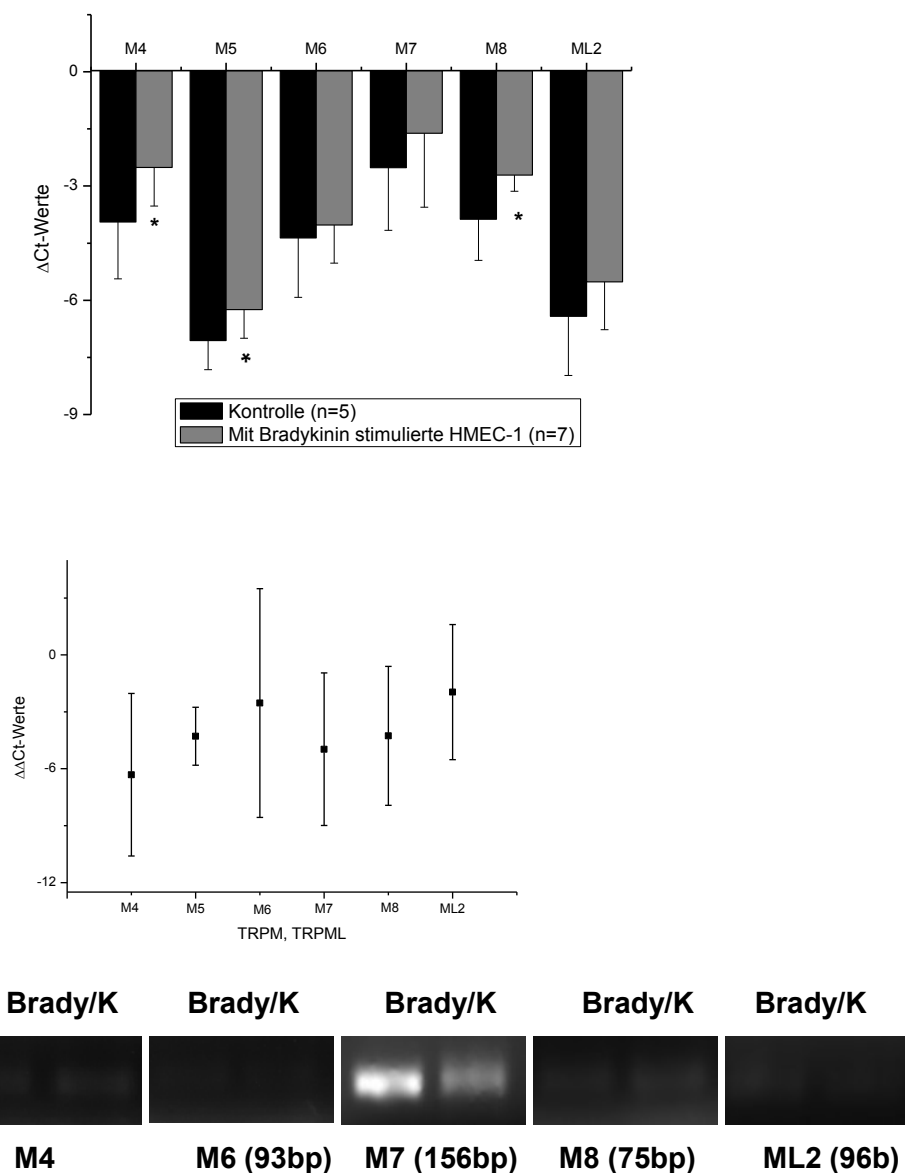


Abb. 3.6b: TRPM4/5/6/7/8, TRPML2 nach Stimulation mit Bradykinin (Brady). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 0,1 μ M Bradykinin stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt. Es zeigten sich signifikante Ergebnisse * ($p < 0,05$) für TRPM4, TRPM5 sowie TRPM8. Darstellung der Δ Ct-Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta$ Ct-Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle.

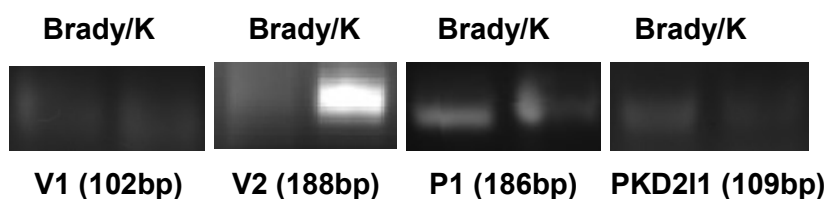
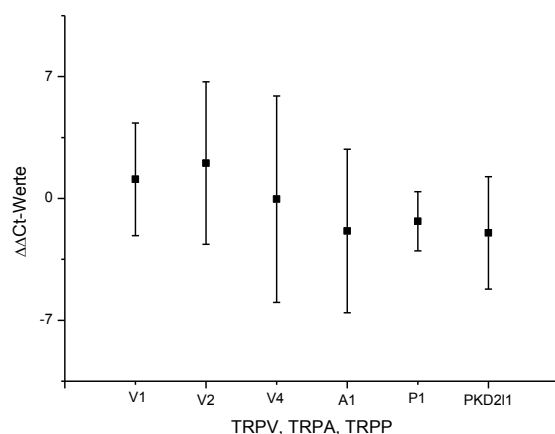
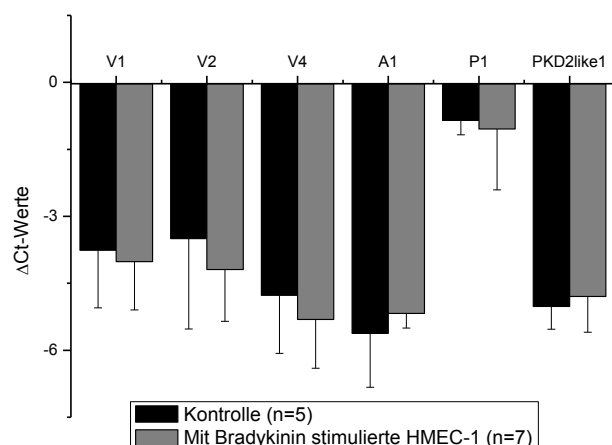


Abb. 3.6c: Expression von TRPV1/2/4, TRPP1, PKD2like1 nach Stimulation mit Bradykinin (Brady). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 0,1 μ M Bradykinin stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$). Darstellung der ΔCt -Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta Ct$ -Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle.

Histamin

Eine weitere der vasoaktiven Substanzen, deren Einfluss auf die Expression der TRP-Kanäle untersucht wurde, stellt Histamin dar (Abbildung 3.7a-c). Dieses Amin bindet über GPCRs an vier verschiedene H-Rezeptoren. Nach intravenöser Injektion von Histamin kommt es, insbesondere über Freisetzung von endothelialen NO, zu einer Vasodilatation über H_1 -Rezeptoren. Dies führt zur Senkung des diastolischen Blutdruckes. Demzufolge hängt die histaminerge Wirkung von der

Ergebnisse

Intaktheit des Endothels ab. Daher erfolgte die Überlegung, ob und wie sich die Expression der TRP-Kanäle verhielt, nachdem HMEC-1 mit Histamin stimuliert wurden. Zum Erhalt der Daten erfolgten sechs Versuche mit HMEC-1, die mit Histamin stimuliert wurden, sowie sechs Kontrollversuche. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

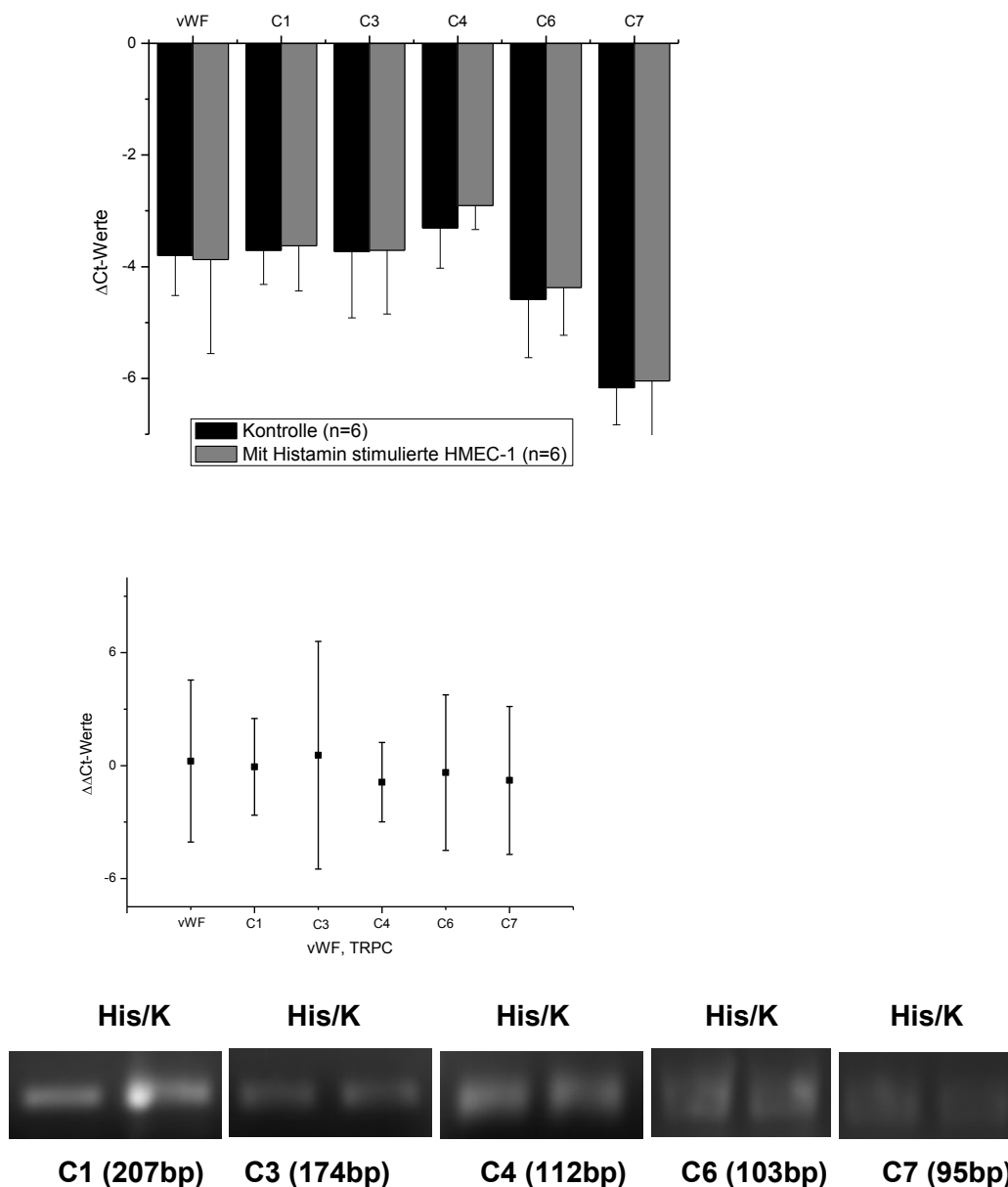


Abb. 3.7a: vWF, TRPC1/3/4/6/7 nach Stimulation mit Histamin (His). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 10 μ M Histamin stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt (n=6). Darstellung der ΔCt -Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta Ct$ -Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$).

Ergebnisse

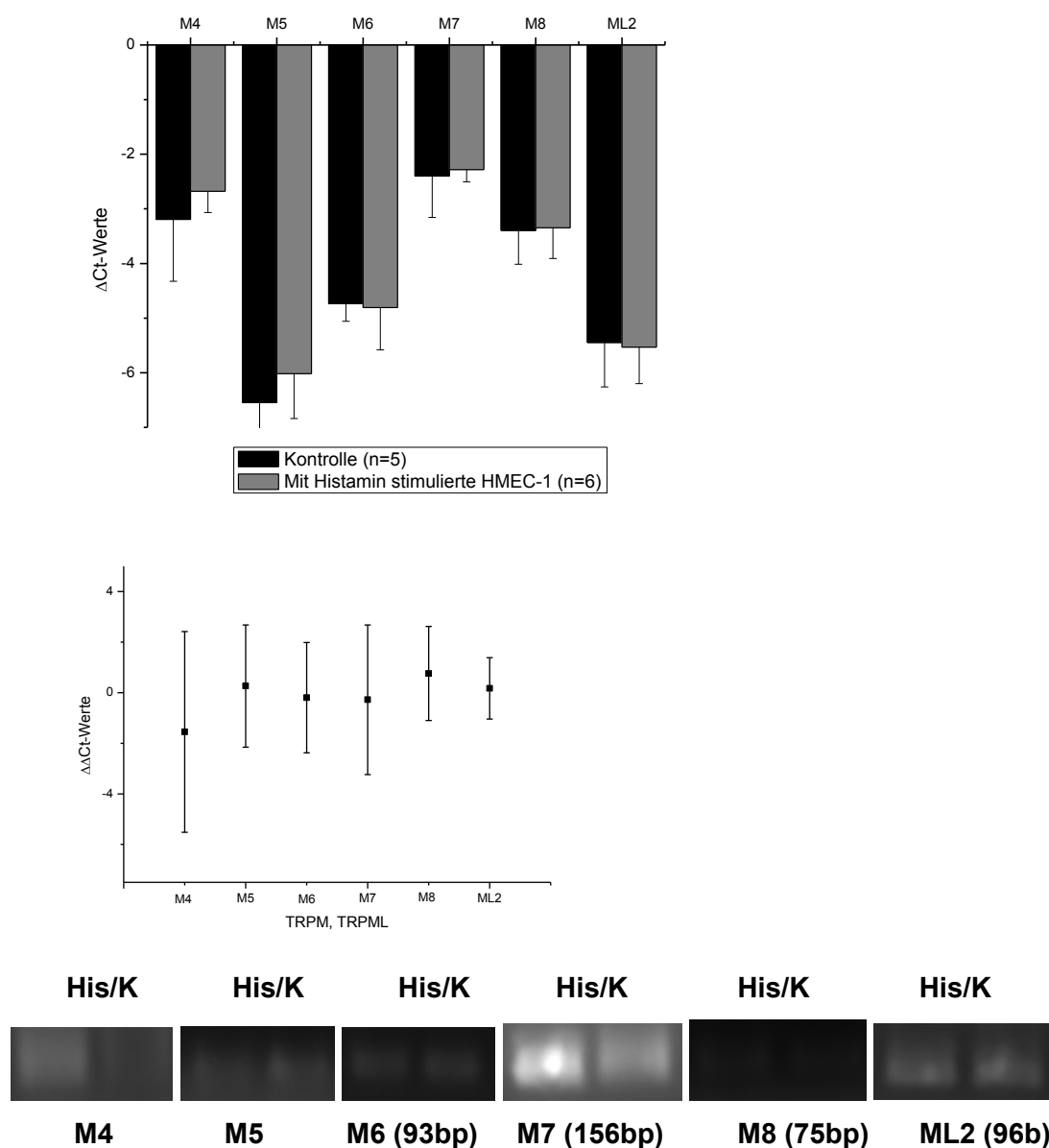


Abb. 3.7b: TRPM4/5/6/7/8, TRPML2 nach Stimulation mit Histamin (His). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 10 μ M Histamin stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt (n=6). Darstellung der Δ Ct-Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta$ Ct-Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$).

Ergebnisse

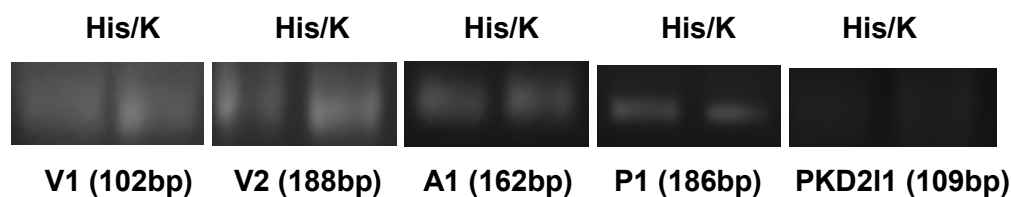
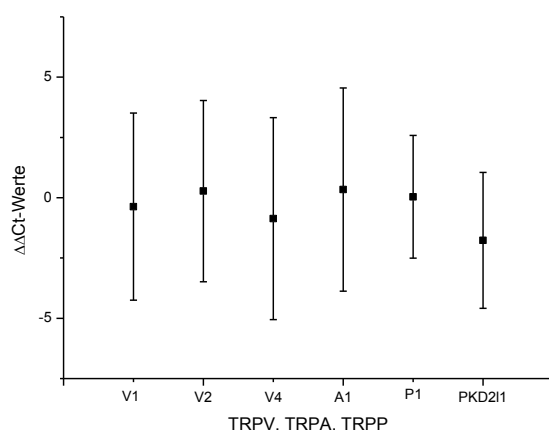
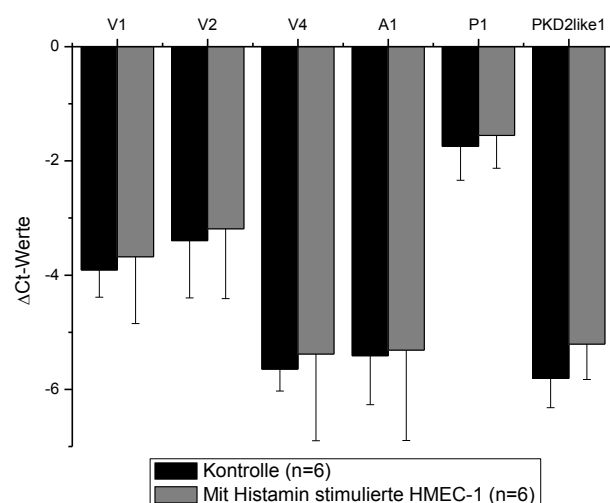


Abb. 3.7c: TRPV1/2/4, TRPA1, TRPP1, PKD2like1 nach Stimulation mit Histamin (His). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 10 μ M Histamin stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt (n=6). Darstellung der ΔC_t -Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta C_t$ -Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$).

Endothelin-1

Endothelin ist ein Peptidhormon aus 21 Aminosäuren, von dem drei Isoformen bekannt sind. Endothelin-1 (ET-1) ist der potenteste bekannte Vasokonstriktor und wird insbesondere von Endothelzellen produziert und freigesetzt. Dort bindet er insbesondere an endotheliale ET_B-Rezeptoren, was zur Freisetzung von NO und Prostazyklin führt. Die vasodilatierende endotheliale Funktion von Endothelin-1 wird durch die direkte vasokonstringierende Wirkung jedoch

Ergebnisse

überspielt. Das besondere an der vasokonstringierenden Wirkung von Endothelin-1 ist dabei die lange Dauer des hypertensiven Effekts. Zusätzlich ist das Peptid an der Proliferation und Hypertrophie glatter Gefäßmuskelzellen über ET_A - und ET_B -Rezeptoren beteiligt. Aufgrund der Bedeutung von Endothelin-1 wurde die Expression der TRP-Kanäle nach Stimulation der HMEC-1 mit Endothelin untersucht (Abbildung 3.8a-c). Es wurden je fünf Versuche mit stimulierten HMEC-1 und fünf Kontrollversuche durchgeführt; hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden.

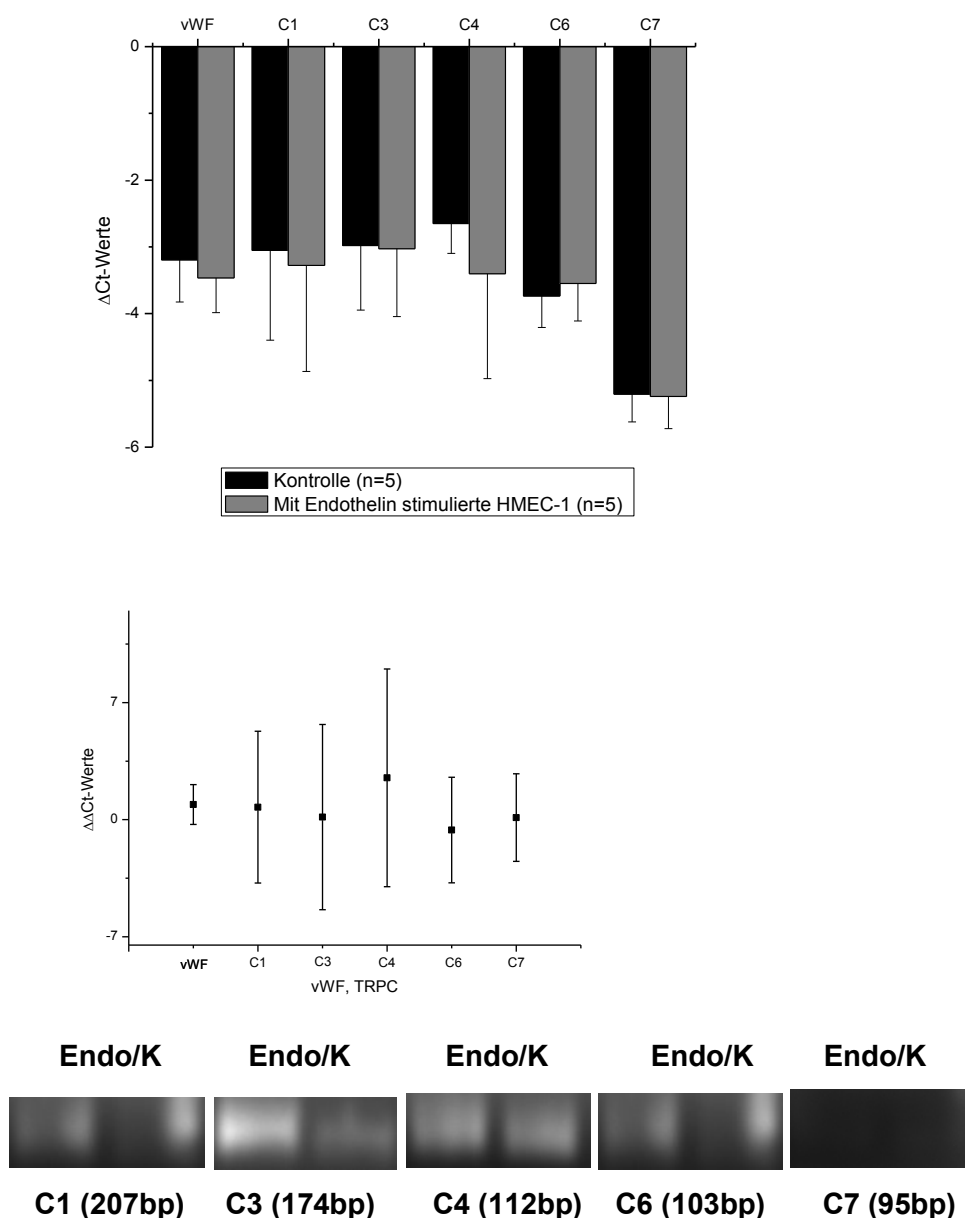


Abb. 3.8a: vWF, TRPC1/3/4/6/7 nach Stimulation mit Endothelin (Endo). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit $0,1\mu M$ Endothelin-1 stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt (n=5). Darstellung der ΔCt -Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta Ct$ -Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$).

Ergebnisse

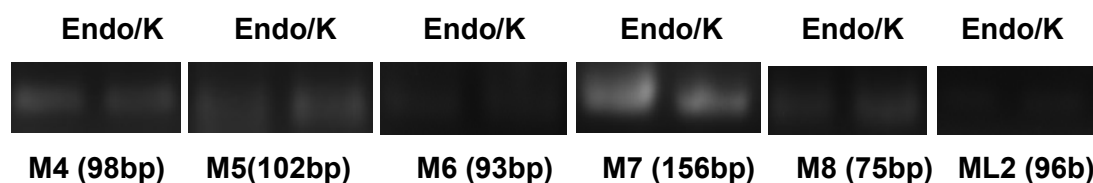
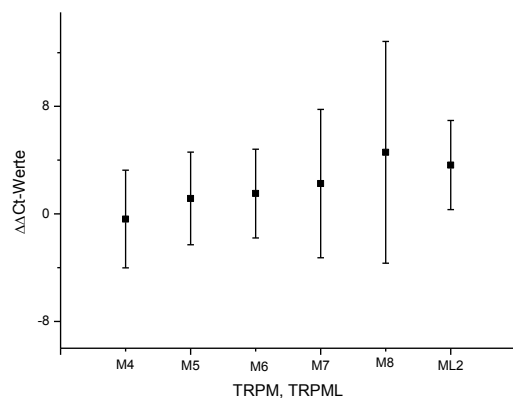
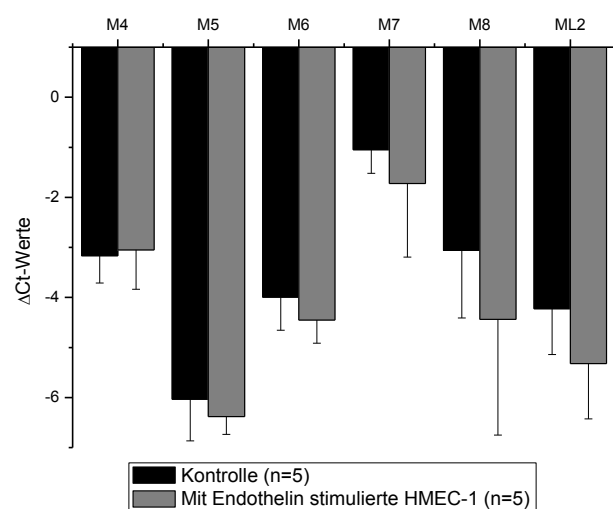


Abb. 3.8b: TRPM4/5/6/7/8, TRPML2 nach Stimulation mit Endothelin (Endo). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 0,1μM Endothelin-1 stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt (n=5). Darstellung der ΔCt-Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der ΔΔCt-Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * (p < 0,05).

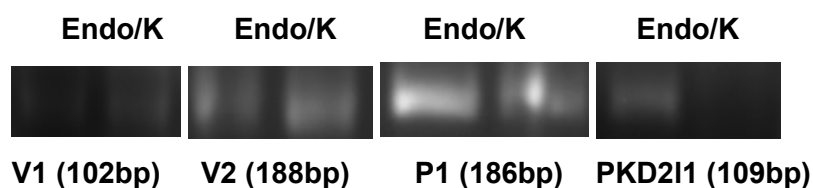
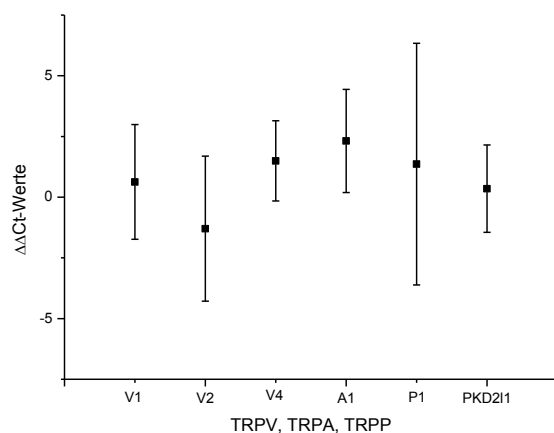
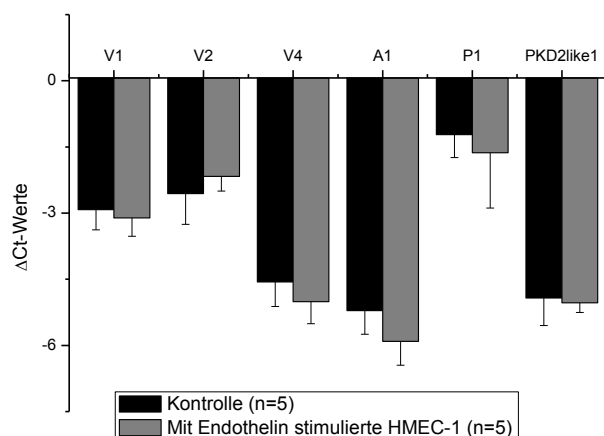


Abb. 3.8c: TRPV1/2/4, TRPA1, TRPP1, PKD2like1 nach Stimulation mit Endothelin (Endo). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 0,1 μM Endothelin-1 stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt (n=5). Darstellung der ΔCt -Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$).

3.3.2 Stimulation der HMEC-1 mit pro-angiogenetischen Faktoren

Verschiedene Aspekte der endothelialen Funktion sowie komplexe Prozesse werden durch Wachstumsfaktoren reguliert. Extrazelluläre Angiogenesefaktoren, wie VEGF, bFGF oder PDGF, stimulieren die Proliferation und Migration von Endothelzellen und begünstigen dadurch die

Ergebnisse

Angiogenese. Ca^{2+} spielt dabei eine bedeutende Rolle. TRP-Kanäle könnten an dem durch Agonisten induzierten Ca^{2+} -Einstrom in Endothelzellen beteiligt sein.

VEGF

Ein besonders wichtiger Wachstumsfaktor mit Bedeutung für das kardiovaskuläre System ist VEGF. Die Expression von VEGF wird über Hypoxie, multiple Wachstumsfaktoren sowie inflammatorische Zytokine reguliert. Um die Bedeutung von VEGF auf die Höhe der Expression der mRNA von TRP-Kanälen zu untersuchen, wurden HMEC-1 mit diesem pro-angiogenetischen Faktor stimuliert. Die Daten hierzu sind in Abbildung **3.9a-c** dargestellt. Es wurden fünf mit VEGF stimulierte Petrischalen und vier Kontrollversuche durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied (*, $p < 0,05$) konnte festgestellt werden bei TRPM8 von HMEC-1, die mit VEGF stimuliert worden waren.

Ergebnisse

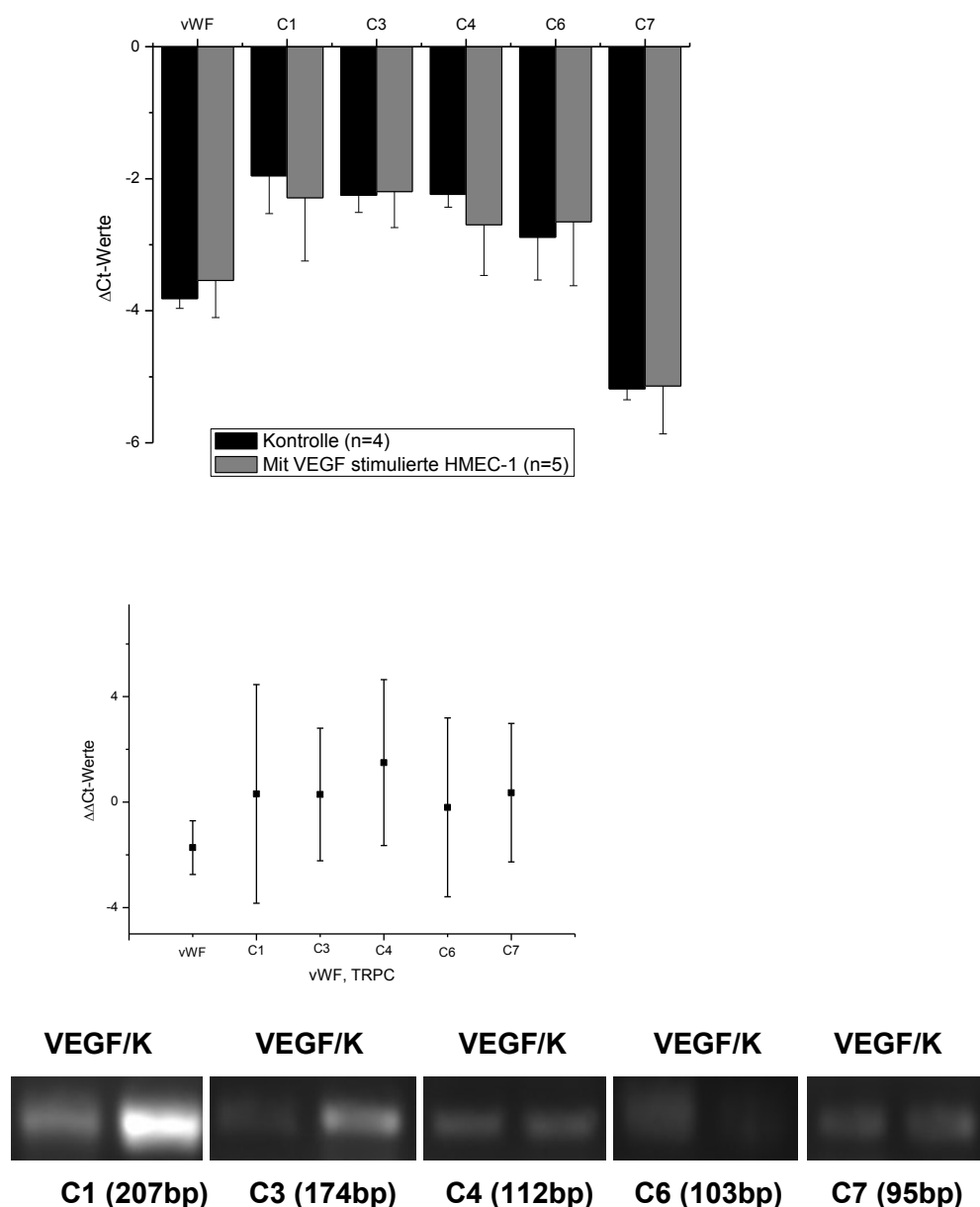


Abb. 3.9a: vWF, TRPC1/3/4/6/7 nach Stimulation mit VEGF. Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 50ng/ml VEGF stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt. Darstellung der ΔCt -Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta Ct$ -Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$).

Ergebnisse

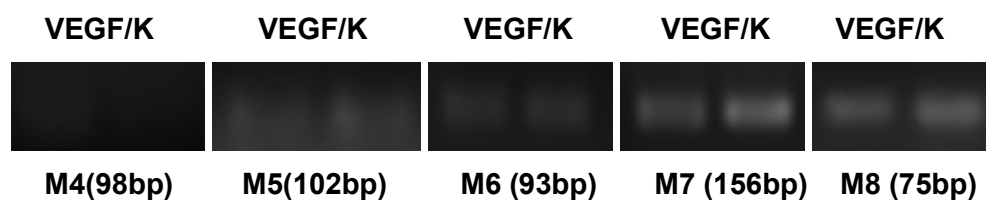
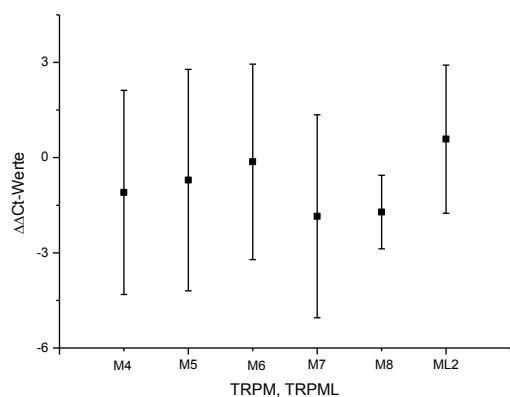
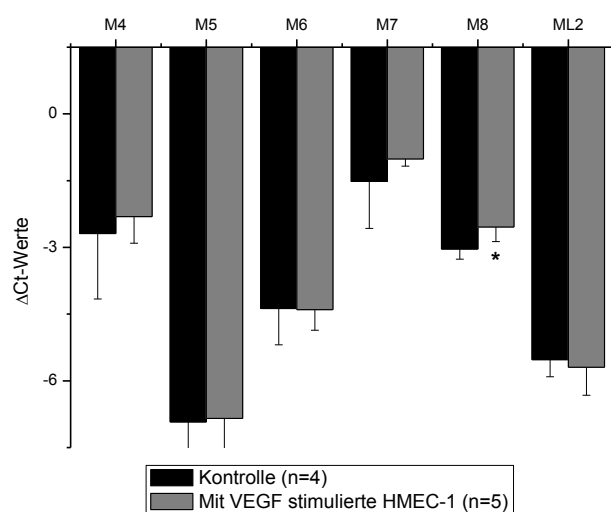


Abb. 3.9b: TRPM4/5/6/7/8, TRPML2 nach Stimulation mit VEGF. Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 50ng/ml VEGF stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt. Signifikant erhöhte Expression unter Stimulation mit VEGF bei TRPM8 * ($p < 0,05$). Es wird die Darstellung der Δ Ct-Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta$ Ct-Werte sowie der zugehörigen Gelelektrophorese der RT-PCR incl. der Kontrolle gezeigt.

Ergebnisse

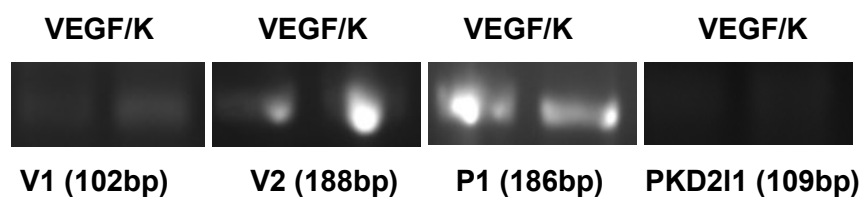
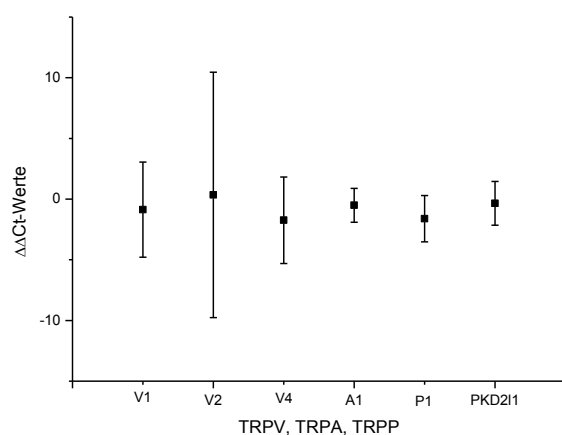
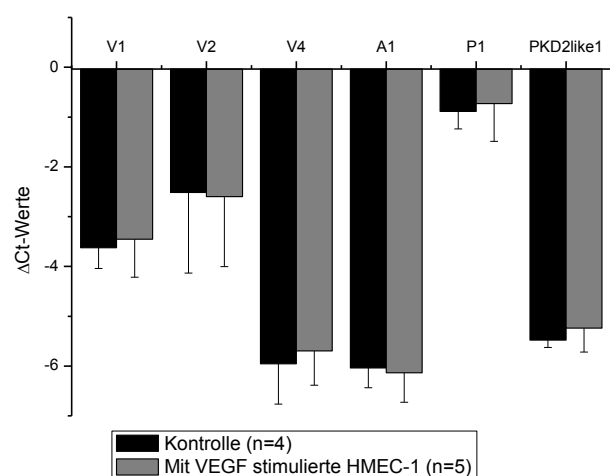


Abb. 3.9ca: TRPV1/2/4, TRPA1, TRPP1, PKD2like1 nach Stimulation mit VEGF. Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 50ng/ml VEGF stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt. Darstellung der ΔC_t -Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta C_t$ -Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrolle. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$).

Erythropoetin

Eine weitere pro-angiogenetische Substanz mit Effekten auf das kardiovaskuläre System ist Erythropoetin (EPO). Es ist bekannt, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, welche mit rhEpo therapiert werden, einen Therapie-induzierten Hypertonus erleiden können. Zudem ist Erythropoetin in der Lage, die Produktion endothelialer vasoaktiver Modulatoren, wie Endothelin-1,

Ergebnisse

zu stimulieren. Daher erfolgte die Überlegung, ob und wie sich die Expression der TRP-Kanäle verhielt, nachdem HMEC-1 mit Erythropoetin stimuliert wurden. Dies wird in Abbildung 3.10 dargestellt. Zur Datenerhebung wurden fünf Versuche durchgeführt: Je fünf mit Erythropoetin stimulierte Petrischalen mit HMEC-1 sowie je fünf Kontrollen. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

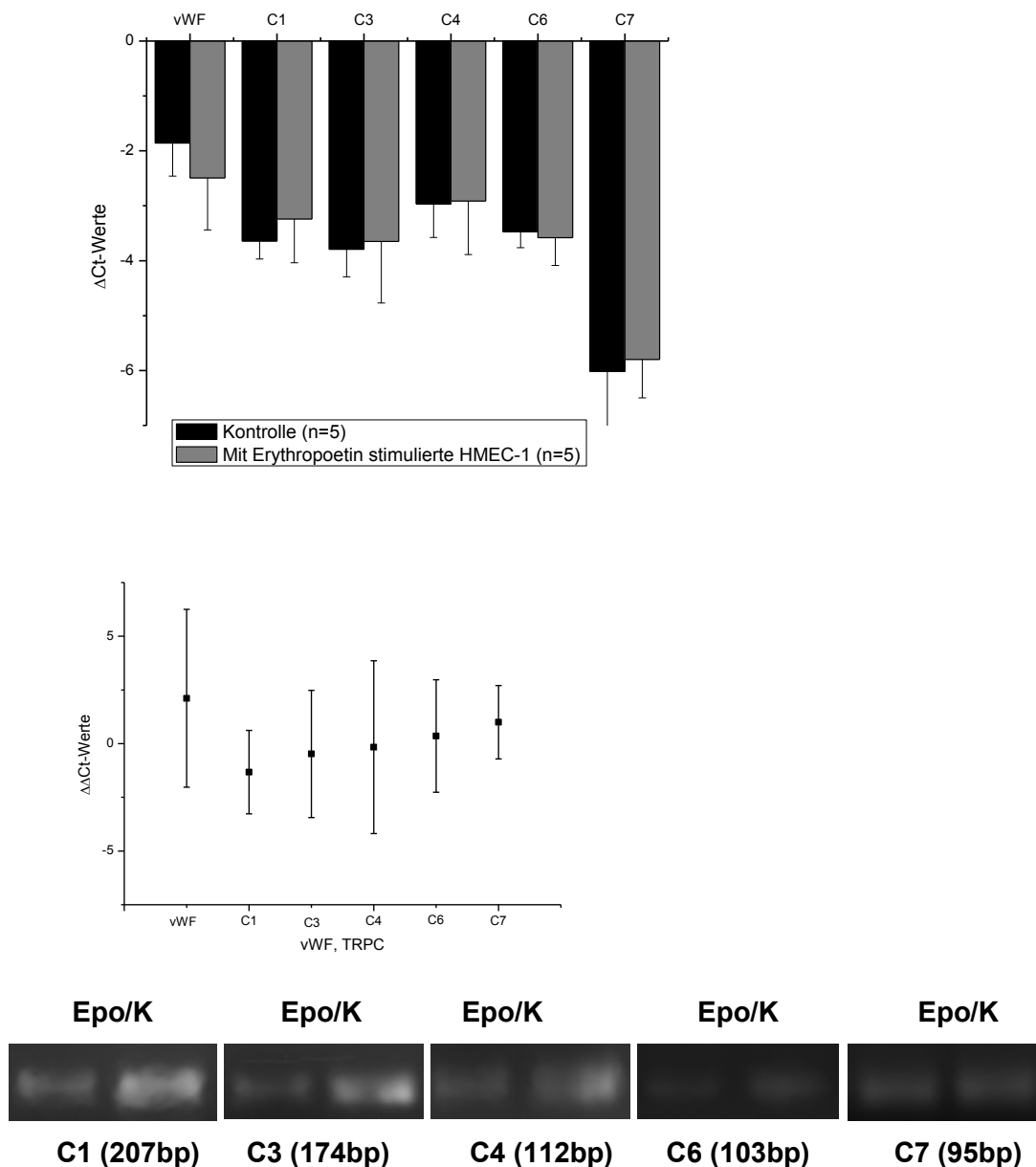


Abb. 3.10a: vWF, TRPC1/3/4/6/7 nach Stimulation mit EPO (Erythropoetin). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 200IE Erythropoetin stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt. Darstellung der ΔC_t -Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta C_t$ -Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrollen. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$).

Ergebnisse

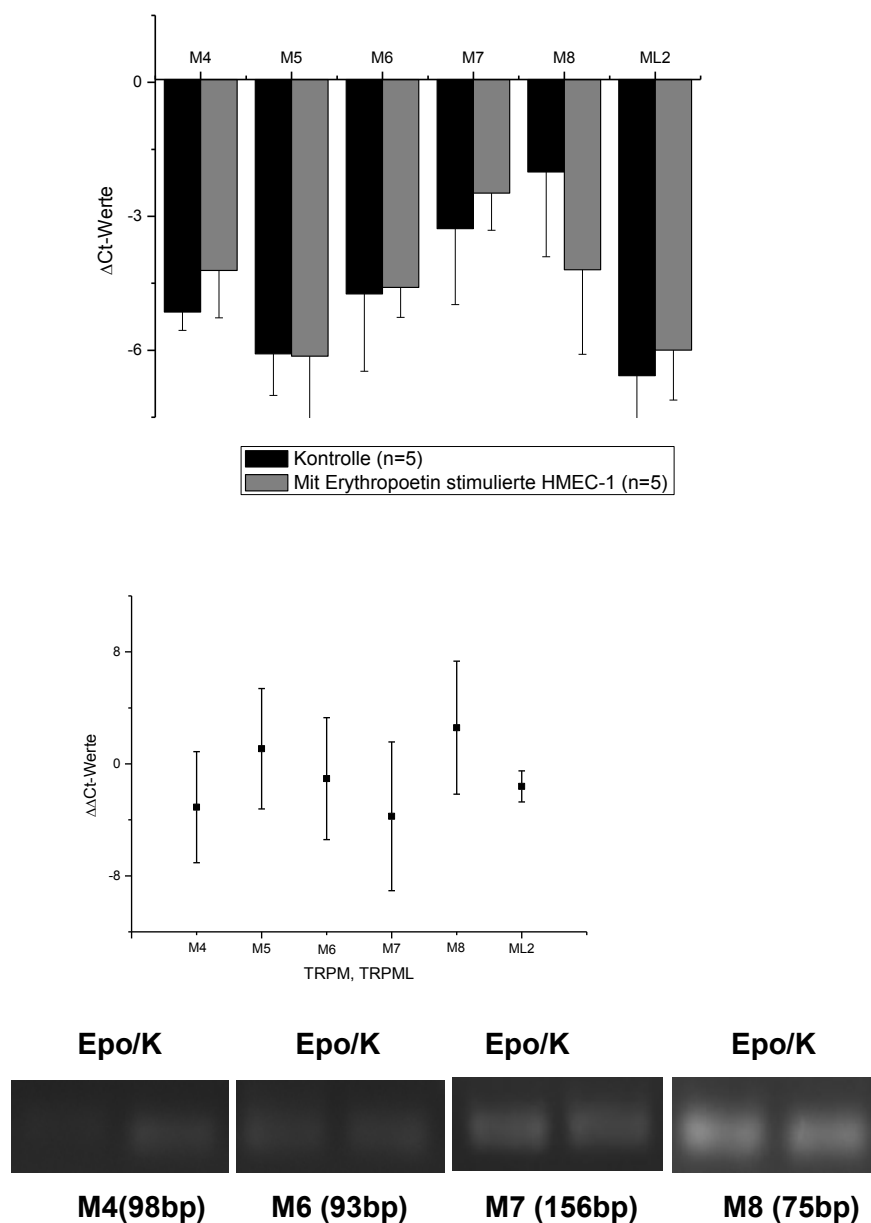


Abb. 3.10b: TRPM4/5/6/7/8, TRPML2 nach Stimulation mit EPO (Erythropoetin). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 200IE Erythropoetin stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt. Darstellung der ΔC_t -Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta C_t$ -Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrollen. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$).

Ergebnisse

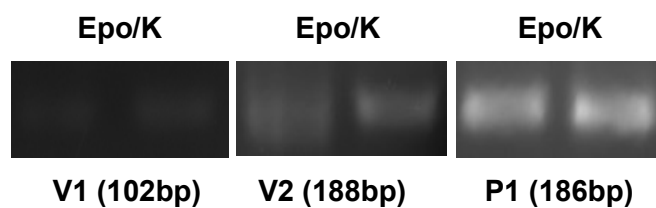
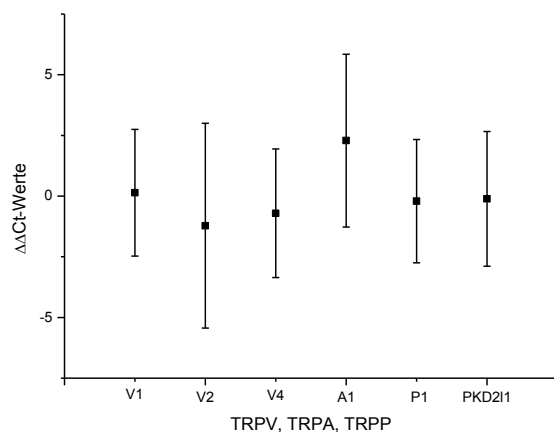
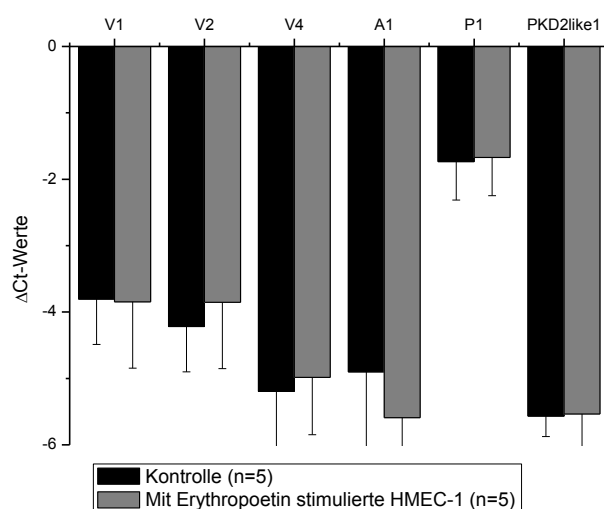
**C TRPV1, V2, TRPA1, TRPP1, PKD2like1**

Abb. 3.10c: TRPV1/2/4, TRPA1, TRPP1, PKD2like1 nach Stimulation mit EPO (Erythropoetin). Dabei wurden die HMEC-1 insgesamt vier Stunden mit 200IE Erythropoetin stimuliert. Die HMEC-1 wurde zuvor 24h auf ein Mangelmedium gesetzt. Darstellung der ΔCt -Werte der dargestellten TRP-Kanäle, der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte sowie der entsprechenden Gelelektrophorese der RT-PCR incl. Kontrollen. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse * ($p < 0,05$).

In der folgenden Tabelle **3.2** werden der Übersicht halber die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen hTRP-Kanäle nach Stimulation mit o.g. vasoaktiven und pro-angiogenetischen Faktoren nochmals dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind **fett** hervorgehoben. Zudem wurde die veränderte Expression

Ergebnisse

der in hMEC-1 in dieser Arbeit nachgewiesenen TRP-Kanäle nach die Stimulation farblich dargestellt: **grün** bedeute eine erhöhte Expression nach Stimulation, **rot** eine niedrigere Expression.

Tabelle 3.2: $\Delta\Delta Ct$ -Werte der hTRP-Kanäle nach Stimulation

Tabelle 3.2.1: $\Delta\Delta Ct$ -Werte der hTRPC-Kanäle

	Bradykinin	Histamin	Endothelin-1	VEFG	Erythropoetin
hVWF	1,466	0,242	0,904	-1,727	2,110
hTRPC1	0,333	-0,065	0,744	0,312	-1,33
hTRPC3	0,217	0,555	0,155	0,289	-0,478
hTRPC4	-2,131	-0,881	2,506	1,497	-0,164
hTRPC6	-0,126	-0,372	-0,619	-0,200	0,359
hTRPC7	-2,188	-0,786	0,121	0,355	0,993

Tabelle 3.2.2: $\Delta\Delta Ct$ -Werte der hTRPV-Kanäle

	Bradykinin	Histamin	Endothelin-1	VEFG	Erythropoetin
hTRPV1	1,100	-0,37	0,626	-0,868	0,135
hTRPV2	2,031	0,274	-1,3	0,346	-1,22
hTRPV4	-0,042	-0,868	1,495	-1,742	-0,7094

Tabelle 3.3.3: $\Delta\Delta Ct$ -Werte der hTRPM-Kanäle

	Bradykinin	Histamin	Endothelin-1	VEFG	Erythropoetin
hTRPM4	-6,317	-1,549	-0,388	-1,096	-3,0952
hTRPM5	-4,287	0,265	1,146	-0,709	1,076
hTRPM6	-2,537	-0,195	1,512	-0,133	-1,056
hTRPM7	-4,970	-0,277	2,255	-1,849	-3,742
hTRPM8	-4,27	0,762	4,585	-1,714	2,584

Ergebnisse

Tabelle 4.4: $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der restlichen hTRP-Kanäle

	Bradykinin	Histamin	Endothelin-1	VEFG	Erythropoetin
hTRPA1	-1,869	0,337	2,312	-0,509	2,285
hTRPP1	-1,309	0,038	1,363	-1,612	-0,206
hPKD2like1	-1,976	-1,769	0,350	-0,348	-0,113
hTRPML2	-1,958	0,174	3,634	0,583	-1,615

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von TRP-Kanälen in humanen Endothelzellen untersucht. Anhand von Experimenten in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) konnte die Expression von TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6 und TRPC7, TRPV1, TRPV2 und TRPV4, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7, und TRPM8, TRPA1, TRPP1, PKD2like1 sowie TRPML2 nachgewiesen werden. Von diesen konnte in HMEC-1 eine besonders hohe Expression von TRPC1, TRPC4, TRPC6, TRPM6, TRPM7, TRPM8 sowie TRPP1 aufgezeigt werden. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass TRP-Kanäle eine wichtige Rolle in Endothelzellen und vermutlich auch bei ihren Funktionen spielen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass sich nach Stimulation der HMEC-1 mit Bradykinin eine signifikant erhöhte Expression von TRPM4, TRPM5 sowie für TRPM8. Auch wies die Expression von TRPM8 eine signifikant höhere Expression in mit VEGF stimulierten HMEC-1 auf. Entgegen der Erwartungen war, trotz der vorhandenen Signifikanz keine deutlich intensivere Expression einzelner TRP-Kanäle nach Stimulation der HMEC-1 zu beobachten.

4.1. Untersuchung der Expression von TRP-Kanälen in HMEC-1

4.1.1. Vergleich mit den in der Literatur erhobenen Daten

Die hier gewonnenen Daten unterstützen die Vermutung, dass in humanen Endothelzellen verschiedene TRP-Kanäle exprimiert werden und dass die einzelnen TRP-Kanäle eine unterschiedlich hohe Expression im Endothel aufweisen. Neben den in dieser Arbeit erhobenen Daten gibt es zahlreiche Publikationen, die ebenfalls die Expression von unterschiedlichen TRP-Kanälen in Endothelzellen untersucht haben. Insgesamt wurde die Expression von mindestens 19 TRP-Homologen in humanen Endothelzellen beschrieben: alle TRPCs (außer TRPC7) (Groschner et al., 1998) (Yip et al. 2004), TRPV1, TRPV3, TRPV4 sowie alle TRPMs (außer TRPM5) (Firth et al. 2007) (Watanabe et al., 2008) (Inoue und Xiong 2009), (Earley und Brayden 2010).

Es zeigen sich dabei jedoch teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Gründe hierfür könnten auf die untersuchte Spezies und das untersuchte Gefäßbett zurückzuführen sein (Chi J-T et al. 2003). Paria et al. haben das Expressionsmuster unterschiedlicher TRPC-Isoformen in drei verschiedenen Endothelzelllinien mittels RT-PCR untersucht. Sie konnten die Expression von TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6 und TRPC7 in HMEC-1 nachweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass TRPC1

und TRPC6 besonders stark exprimiert sind (Paria et al. 2004). Dass auch die Höhe der Expression einzelner TRP-Kanäle vermutlich mit untersuchter Spezies und untersuchtem Gefäßbett zusammenhängt, konnte u.a. an frisch isolierten Rattenarterien gezeigt werden (Facemire et al. 2004).

Ein weiterer Grund für die widersprüchlichen Daten der endothelialen TRP-Expression könnte von der verwendeten Methodik abhängen, d.h. RT-PCR, Western Blot oder Immunhistochemie. Viele Daten zur endothelialen Expression von TRP-Kanälen stammen aus Untersuchungen kultivierter Endothellinien oder primär kultivierter Zellen. Problematisch hierbei ist, dass deren Ionenkanalexpression nicht dem *in vivo* Expressionsmuster eines nativen Gewebes entsprechen muss (Yao und Garland 2005). Eine der wenigen *in situ* Messungen an Blutgefäßen stammt von Kohler et al. Unter Verwendung der Methode der Single-cell RT-PCR wurde die Expression von TRPC1 und TRPC3 bis TRPC6 in Endothelzellen humaner Mesenterialarterien untersucht (Kohler et al. 2001). Yip et al. hingegen nutzten für die Untersuchung der Expression von TRP-Kanälen in Endothelzellen intakter humaner Koronar- und Zerebralarterien, neben der RT-PCR, sowohl die *in-situ*-Hybridisierung als auch die Immunhistochemie (Yip et al. 2004).

Demzufolge ist oft noch ungeklärt, welche der exprimierten TRP-Kanäle eine funktionelle Bedeutung im vaskulären System haben.

4.1.2. Potentielle Gründe für die Diversität endothelialer TRP-Kanäle

Des Weiteren konnte in mehreren Publikationen gezeigt werden, dass TRP-Kanäle an verschiedenen physiologischen Vorgängen der Endothelzellen teilnehmen (Yao und Garland 2005). Dies lässt die Vermutung zu, dass diese Kanäle unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Funktionen innerhalb des kardiovaskulären Systems ausüben. Aufgrund dessen stellt sich die Frage, warum Endothelzellen so viele verschiedene TRP-Kanäle besitzen, welche fast alle eine Bedeutung für die $[Ca^{2+}]_i$ haben. Hierfür stehen mindestens zwei Erklärungsansätze zur Verfügung:

Zum einen könnten die verschiedenen Mechanismen für Aktivierung und Modulation der Vielzahl der exprimierten TRP-Kanäle es der Endothelzelle erlauben, den Ca^{2+} -Einstrom unter unterschiedlichsten Bedingungen zu ermöglichen. So wird TRPC4 unter anderen durch Exposition der Endothelzelle gegenüber ATP aktiviert (Freichel et. al. 2001), während TRPV1 durch Kontakt der Zelle mit Endokannabinoiden aktiviert wird (Ross 2003). Als Konsequenz der Aktivierung individueller TRP-Kanäle kommt es zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ innerhalb einzelner Zellkompartimente. Dies könnte mit der Synthese und Freisetzung vasorelaxierender Substanzen, wie NO, Prostazyklin und EDHF, in der Endothelzelle verknüpft sein. Dadurch würde die durch verschiedene TRP-Kanäle getriggerte Stimulation zu einem gemeinsamen Ergebnis führen: der Freisetzung eines Vasodilatators

(Yao und Garland 2005). Auch andere zelluläre Vorgänge der Endothelzelle könnten darauf zurückzuführen sein.

Zum anderen könnte die Aktivität verschiedener TRP-Kanäle zu unterschiedlichen funktionellen Antworten führen. Dies könnte auf Unterschiede der Kanaleigenschaften (Ionenpermeabilität, Calciumselektivität) oder Unterschieden der Expression von TRP-Kanälen in Endothelzellen unterschiedlicher Gefäßbette oder unterschiedlicher endothelialer subzellulärer Kompartimenten zurückzuführen sein. So könnten Endothelzellen aus verschiedenen Gefäßbetten Enzyme und Proteine enthalten, die für spezifische Funktionen dieser Region verantwortlich sind. Ähnliches gilt für unterschiedliche subzelluläre Kompartimente oder zytoplasmatische Regionen (Yao und Garland 2005). Ein Beispiel stellt die unterschiedliche Expression zweier TRPC-Kanäle dar: TRPC5 wird in Endothelzellen von humanen Koronararterien exprimiert (Yip et al. 2004), jedoch nicht in denen humaner Pulmonalarterien, die u.a. TRPC4 exprimieren. Demzufolge könnte TRPC5 anderen Funktionen in humanen Koronararterien unterliegen als TRPC4 in humanen Pulmonalarterien (Yao und Garland 2005). Somit kann die unterschiedliche Zusammensetzung der TRP-Kanäle Ausdruck der Anpassung an unterschiedliche Aufgaben sein.

Ebenso spielt die Tatsache, dass funktionelle TRP-Kanäle aus vier TRP-Untereinheiten bestehen, ebenfalls eine bedeutende Rolle (Birnbauer et al. 1996). Die TRP-Untereinheiten können entweder Homo- oder Heteromultimere bilden. Aufgrund der vielen, in humanen Endothelzellen vorkommenden TRP-Kanälen, könnten sich die verschiedenen TRP-Homologe, in Abhängigkeit von ihrer Unterfamilie, zur Kanal-Heteromultimeren zusammenlagern. Dadurch könnten sich multiple Formen von Heterotetrameren aus den einzelnen TRP-Unterfamilien bilden, die die Endothelzellen mit einer Vielfalt von verschiedenen für Ca^{2+} -permeablen Kanälen mit unterschiedlichen Eigenschaften versorgen (Yip et al. 2004). Hierbei ist es möglich, dass die Kanal-Multimere abhängig von ihrer Zusammensetzung unterschiedliche Eigenschaften und somit unterschiedliche Funktionen aufweisen. Wichtig sind auch das Zusammenspiel mit interagierenden Proteinen und die Lokalisation in unterschiedlichen Zellkompartimenten, die die Funktion modulieren.

4.1.3. Mögliche Bedeutung endothelialer TRP-Kanäle in HMEC-1

In der vorliegenden Arbeit wurde mit kultivierten HMEC-1 gearbeitet. Dabei zeigte sich in den RT-PCR Experimenten eine besonders hohe Expression der cDNA bestimmter TRP-Kanäle. Diese waren TRPC1, TRPC4, TRPC6, TRPM6, TRPM7, TRPM8 sowie TRPP1.

TRPC

Es ist bekannt, dass von der TRPC-Familie in vaskulären Endothelzellen die Expression von TRPC1 und TRPC4 prädominant ist gegenüber TRPC3 oder TRPC6 (Groschner et al. 1998), (Kohler et al.

2001). Die Bedeutung der in dieser Arbeit gezeigten hohen Expression von TRPC1, TRPC4 und TRPC6 in HMEC-1 liegt vermutlich in ihrer Bedeutung als unterschiedliche mechanosensitive Ca^{2+} -Kanäle. So gehört TRPC1 zu den *stretch-activated* und TRPC6 zu den *pressure-activated* Kanälen. Es wird sogar vermutet, dass TRPC1 an dem SOC vermittelten Ca^{2+} -Einstrom beteiligt ist (Brough et al. 2001).

Die Bedeutung von TRPC4 hingegen besteht in der Funktion, mit TRPC3, TRPM2, TRPM7, als Sensor für oxidativen Stress (Yao und Garland 2005) und in der Kontrolle der endothelialen Gefäßpermeabilität von Pulmonalarterien zu wirken. Das Fehlen von TRPC4 in TRPC4^{-/-}-Mäusen hemmt die Erhöhung der Lungengefäßpermeabilität um 50%. Zudem reagieren Endothelzellen von TRPC4^{-/-}-Mäusen nach Stimulation mit Thrombin oder PAR-1 nicht mit Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dies könnte an der Interaktion von TRPC4 mit Protein 4.1, einem endothelialen Zytoskelettprotein, liegen (Dietrich et al. 2010). An der endothelialen Gefäßpermeabilität sind vermutlich auch TRPC1 und TRPC6 beteiligt (Yao und Garland 2005).

Als interessant erweist sich die hohe Expression von TRPC6 in HMEC-1. Im kardiovaskulären System ist TRPC6 für den α_1 -Adrenorezeptor aktivierten Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich (Inoue et al. 2001). Auch spielt TRPC6 vermutlich eine Rolle bei dem VEGF-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in die Endothelzelle.

TRPM

Sowohl TRPM6 als auch TRPM7 sind in Endothelzellen humaner Lungenarterien nachgewiesen worden. Beide Kanäle besitzen eine hohe Mg^{2+} -Permeabilität und sind essentiell für die Mg^{2+} -Homeostase (Schmitz et al. 2003). Obwohl es wenig Informationen bezüglich der Funktion der endothelialen TRPM6- und TRPM7-Kanäle gibt, spielt Mg^{2+} mit weitreichender Bedeutung für verschiedenste endotheliale Funktionen hierbei vermutlich eine bedeutende Rolle. Dazu gehört u.a. die Angiogenese. Es besteht ebenfalls eine direkte Korrelation zwischen dem endothelialen Mg^{2+} -Gehalt und der durch Wachstumsfaktoren vermittelter Endothelzellproliferation: Mitogene Stimuli erhöhen den Mg^{2+} -Einstrom, die Mg^{2+} -Depletion jedoch führt zum Wachstumsstillstand. Das bedeutet, dass Wachstumsfaktoren den Mg^{2+} -Eintritt in Endothelzellen, insbesondere über TRPM7-Kanäle, stimulieren könnten (Yao und Garland 2005).

Die Expression von TRPM7 ist weit verbreitet mit Transkripten in soliden Organen, wie Leber, Lunge oder Niere sowie auch in hämatopoetischen Zellen oder lymphatischen Zelllinien. Des Weiteren wird TRPM7 in EC und VSMCs von Menschen und Mäusen exprimiert und ist funktionell aktiv in diesen Zellen (He et al. 2005) (Inoue und Xiong 2009). Auch in VSMCs von Ratten findet sich TRPM7, wobei sich eine unterschiedliche Expression in Zellen von WKY und SHR aufzeigen lässt und die

basale Expression von TRPM7 niedriger in SHR verglichen mit WKY ist. Auch nach Stimulation mit dem vasoaktiven Angiotensin II kam es lediglich zu einer erhöhten Menge von TRPM7 in WKY. Aufgrund dieser Daten und der Bedeutung für die Mg^{2+} -Homeostase könnte TRPM7 eine Bedeutung bei Hypertonie haben (Touyz et al. 2006). Ob diese Bedeutung des Kanals auch in Endothelzellen eine Rolle spielt, muss noch untersucht werden.

Auch die hohe Expression von TRPM6 in Endothelzellen erweist sich als besonders interessant, zumal dieser Kanal ein vor allem auf Epithelien des Magen-Darm-Traktes und der Nieren beschränktes Expressionsmuster aufweist. Jedoch konnte ebenfalls die Expression von TRPM6 in VSMCs von Ratten gezeigt werden. Obwohl dieser Kanal für Mg^{2+} permeabel ist, konnte keine unterschiedliche Expression in SHR und WKY nachgewiesen werden. Daher muss TRPM6 keine kritische Bedeutung in VSMCs bei der veränderten Mg^{2+} -Homöostase bei Hypertonie haben (Touyz et al. 2006). Die Untersuchung der endothelialen Expression von TRPM6 zeigt jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Obwohl in dieser Arbeit eine besonders hohe Expression von TRPM6 in HMEC-1 gezeigt werden konnte, trifft dies nicht auf die Daten von Inoue und Xiong in HUVEC trotz gleicher verwendeter Methodik zu (Inoue und Xiong 2009). Ein möglicher Grund ist die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien, wobei HMEC-1 mikrovaskulären und HUVEC hingegen makrovaskulären Ursprungs sind, und die damit verbundenen unterschiedlichen Expressionsmuster von Ionenkanälen. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass HUVEC oft als fetale Zellen angesehen werden, HMEC-1 jedoch adulten Ursprungs sind. Demzufolge könnte ebenfalls das Alter der Endothelzellen das Expressionsmuster endothelialer TRP-Kanäle mitbestimmen.

Ein weiterer besonders hoch exprimierter TRP-Kanal in HMEC-1 ist TRPM8. Da TRPM8 ein durch kühlende Substanzen, wie Menthol und weitere spezifische Substanzen (Sherkheli et al. 2010), und auch durch Kälte aktivierbarer Kanal ist, könnte TRPM8 in Endothelzellen zu der durch Kälte bedingten Vasokonstriktion beitragen. In glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten konnten Johnson et al. zeigen, dass TRPM8 in VSMC exprimiert wird und zu Vasokonstriktion oder Vasodilatation, abhängig vom vorherigen Gefäßtonus, führen kann. Um beurteilen zu können, ob die Expression von TRPM8 in Endothelzellen mit dazu beiträgt, müssen weitere Studien erfolgen (Johnson et al. 2009).

TRPP

Auch TRPP1 weist eine besonders hohe Expression in HMEC-1 auf. TRPP1 gehört zu den durch Fluss aktivierten Ionenkanälen in Endothelzellen und hat möglicherweise dadurch Bedeutung für die Erfassung des Blutflusses durch die Endothelzelle. Jedoch bildet TRPP1 nicht alleine einen funktionsfähigen Kanal, sondern nur zusammen mit TRPP2. Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Mutationen der Gene von TRPP1 oder TRPP2 führen zu ADPKD. Eine interessante Beobachtung ist das Auftreten eines Hypertonus bei Patienten mit ADPKD deutlich vor

Beeinträchtigung der Nierenfunktion aufgrund gestörter Endothel-abhängiger Vasorelaxation mit verminderter Aktivität der eNOS (Wang et al. 2000) sowie ein erhöhter Endothelinplasmaspiegel. Dies könnte zum Progress der Erkrankung beitragen (Kim et al. 2000) (Devuyst et al. 2003). Ebenso könnte die primäre Disruption von im Endothel und in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiertem Polyzystin-1 und -2 (Griffin et al. 1997) (Torres et al. 2001) zu der frühzeitigen Entwicklung des Hypertonus beitragen (Ecder und Schrer 2009).

4.2 Veränderungen der mRNA Expression von TRP-Kanälen in stimulierten HMEC-1

In Endothelzellen ist der Ca^{2+} -Einstrom ein bedeutender physiologischer Vorgang. Dieser wird durch vasoaktive und pro-angiogenetische Faktoren, die an GPCR bzw. Tyrosinkinase-Rezeptoren gekoppelt sind, getriggert (Nilius et al. 1993) (Munaron und Fiorio Pla 2000). Da TRP-Kanäle für Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle sind, stellte sich die Frage, ob die Stimulation von HMEC-1 zu einer veränderten TRP-Expression führt. Mittels RT-PCR konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass spezifische vasoaktive und pro-angiogenetische Faktoren die Expression bestimmter TRP-Kanäle in HMEC-1 beeinflussen: Nach Stimulation mit Bradykinin zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von TRPM4, TRPM5 sowie für TRPM8. Die Expression von TRPM8 wies eine signifikant höhere Expression in mit VEGF stimulierten HMEC-1 auf. Entgegen der Erwartungen war, trotz statistischer Signifikanz, eine deutliche Differenz zwischen stimulierten und nicht-stimulierten HMEC-1 nicht zu beobachten. Grund hierfür ist die oft zu beobachtende hohe Standardabweichung bei TRP-Kanälen mit großer optischer Differenz zwischen stimuliertem und nicht-stimuliertem TRP-Kanal, wie beispielsweise TRPC4 nach Stimulation mit Endothelin und Bradykinin. Obwohl es logisch stimmig ist, dass TRPC4 nach Stimulation mit dem Vasodilatator Bradykinin runterreguliert ist und nach Stimulation mit dem Vasokonstriktor Endothelin hochreguliert ist, geht die Standardabweichung über 0 hinaus, so dass von keinem statistisch signifikanten Ergebnis auszugehen ist.

Es gibt wenige Daten in der Literatur bezüglich der Expression von TRPM-Kanälen überhaupt und gar keine für TRPM8 nach Stimulation von Endothelzellen. Gegenüber VEGF121 wurde lediglich das Expressionsmuster von TRPC3 die Exposition kultivierter humaner Endothelzellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass VEGF121 zu einer verminderten Expression von TRPC3 führt. Die Runterregulation von TRPC3 war begleitet von einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom in die Endothelzellen. Zusätzlich konnte in humanen vaskulären Endothelzellen direkt gezeigt werden, dass TRPC3 an der Regulation des Blutdruckes beteiligt ist (Thilo et al. 2009). Weitere Daten zu TRPC3 kommen von Lui et al. Sie konnten zeigen, dass die Expression von TRPC3 signifikant höher im

Gefäßsystem von erwachsenen, hypertensiven SHR im Vergleich zu normotensiven jungen prä-SHR und WKY ist. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass TRPC3-Kanäle direkt am Angiotensin-II-induziertem Ca^{2+} -Influx beteiligt sind. Auch in Gewebe der Aorta war TRPC3 signifikant höher exprimiert in SHR (Liu et al. 2009). Diese Ergebnisse tragen zu den vorhandenen Daten bei, die zeigen, dass TRP-Kanäle an vasoregulatorischen Vorgängen beteiligt sind, und insbesondere, dass TRPC3 eine mögliche Bedeutung bei der Pathogenese der essentiellen Hypertonie hat.

Des Weiteren ist bekannt, dass die vasoaktiven Substanzen Aldosteron und Angiotensin II die Expression der mRNA von TRPM7 in VSMCs signifikant erhöhen. Viele vasoaktive Faktoren beeinflussen die Funktion von VSMCs; von besonderer Bedeutung ist hierbei Angiotensin II. Angiotensin II stimuliert Kontraktion, Wachstum und Entzündungsreaktionen in VSMCs, zum Teil mittels Mg^{2+} -abhängiger Prozesse. Aldosteron hingegen ist ein Mineralokortikoid mit Einfluss auf den zellulären Mg^{2+} -Metabolismus. Es wird zunehmend als Modulator von Gefäßfunktionen anerkannt (He et al. 2005). Zudem konnte in Podozyten gezeigt werden, dass Angiotensin II zu einer erhöhten Expression von TRPC6 führt und zu einer verstärkten Glomerulosklerose (Nijenhuis et al. 2011).

Es stellt sich die Frage, warum die Expression bestimmter TRP-Kanäle durch die oben genannten Faktoren erhöht wird. Genaue Mechanismen, wie diese Agonisten die TRP-Expression kontrollieren, sind nicht bekannt. Da jedoch diese Substanzen, insbesondere die pro-angiogenetischen Faktoren Erythropoetin und VEGF, die Aktivität diverser Transkriptionsfaktoren stimulieren, könnten diese bedeutsam für die de novo Synthese von TRP-Kanälen spielen.

4.3. Kritische Bewertung der Methodik

Bezüglich der Expression spezifischer TRP-Untereinheiten, insbesondere der am meisten untersuchten TRPC-Familie in vaskulären Endothelzellen, gibt es widersprüchliche Daten (Yip et al. 2004). Da es Daten gibt, die ein unterschiedliches Expressionsmuster sogar im gleichen Zelltyp beschreiben, sollte bei der Interpretation dieser vorsichtig vorgegangen werden, weil die Expression der TRP-Kanäle sich unter kultivierten Bedingungen und/oder bei der seriellen Verteilung von Zellen verändern kann.

Des Weiteren wurden fast alle in der Literatur erhobenen Daten mittels der hoch sensitiven Methode der RT-PCR gewonnen. Die *Real-time* RT-PCR ist derzeit die am weitesten verbreitete Methode, um die Genexpression qualitativ und semi-quantitativ zu untersuchen. Die korrekte Interpretation der dadurch gewonnen Daten hängt jedoch von mehreren Faktoren an: der Vorbereitung der Proben, der

Wahl der notwendigen Primer, der richtigen PCR-Bedingungen und ob ein Verfahren verwendet wurde, um falsche RT-PCR Signale von genomischer DNA zu verhindern (Yip et al. 2004).

Die verwendeten Verfahren zur Reduktion des Kontaminationsrisikos wurden bereits in Kapitel 2.4.4 dargestellt. Zudem erfolgten weitere Maßnahmen: Als externer Standard wurden DNA-Verdünnungsreihen mit bekannter Template-Menge erstellt. Aus den für die Verdünnungsstufen ermittelten Ct-Werte wurde eine Standardkurve ermittelt. Mittels dieser konnte auf die Menge an Zielgen in der untersuchten Probe rückgeschlossen werden (Freeman et al. 1999). Die Erstellung einer Standardkurve ist aufwendig und beinhaltet zahlreiche Fehlerquellen. Die zur Bestimmung der Konzentration der cDNA verwendete OD-Methode weist eine hohe Variabilität auf. Außerdem ist die Lagerung der Standardlösungen über einen längeren Zeitraum, ohne dass insbesondere die hochverdünnte cDNA degradiert, schwierig. Die Herstellung einer neuen Standardlösung für jede PCR ist sehr arbeitsintensiv und reduziert die Zahl der in jeder PCR messbaren Proben im Gerät.

Das *house-keeping-Gen* und die Zielgene wurden in gleicher Weise durch unterschiedlich suffizientes Zellwachstum und effiziente Extraktion und Präparation der mRNA in Mitleidenschaft gezogen, so dass ein Einfluss dieser Faktoren auf die Messergebnisse verhindert wurde. Daher wurde mit dem *house-keeping-Gen* hGAPDH als internem Standard die relative Quantifizierung durchgeführt. Dies ist üblich, da die konsekutive Expression von hGAPDH in Endothelzellen bekannt ist. Des Weiteren wurde vWF als zusätzlicher interner Standard angewandt, um demonstrieren zu können, dass die HMEC-1 nicht ihr für Endothelzellen typisches Expressionsmuster durch Kultivierung verloren haben. Die relative Quantifizierung der Daten wurde mittels der oben beschriebenen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode durchgeführt (Livak und Schmittgen 2001).

Ein weiteres für Endothelzellen typisches Problem ist, dass die Expression endothelialer Ionenkanäle ihre Erscheinung in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen anpassen. Daher ist Expression von Ionenkanälen bzw. Genen allgemein in Endothelzellen sehr variabel und variiert mit Zellisolation, Kultur sowie Wachstumsbedingungen. Zudem weisen Endothelzellen eine regionale Heterogenität auf mit u.a. Unterschiede in der Ca^{2+} -Signalgebung, bei immunologischen und metabolischen Eigenschaften, sowie in der Freisetzung von Mediatoren der Endothel-abhängigen Vasodilatation (Nilius und Droogmans 2001).

4.4 Funktionelle Relevanz

TRP-Kanäle werden in fast allen kardiovaskulären Geweben exprimiert und bestehen aus SOCs, ROCs, SACs und LGCs Ca^{2+} -Kanälen. Die pharmakologische Relevanz von TRP-Kanälen in humanen Endothelzellen wird durch die Vielzahl der dort exprimierten Kanäle verdeutlicht. Endothelzellen exprimieren multiple Isoformen von TRP-Kanälen, die auf diverse Stimuli reagieren, indem sie endotheliale Signalwege für Ca^{2+} modulieren. Fehlfunktion und Dysregulation von TRP-Kanälen sind mit endothelialer Dysfunktion assoziiert. Dadurch könnte die Fehlfunktion eines oder mehrerer Isoformen zu kardiovaskulärer Dysfunktion führen und nachfolgend zu spezifischen Erkrankungen des Menschen, wie Hypertonie, beitragen (Yao und Garland 2005). Die polymodalen Funktionen von TRP-Kanälen machen sie zu besonders interessanten Kandidaten für die zukünftige Forschung und Entwicklung neuer therapeutischer Strategien in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen. Aufgrund beispielsweise ihrer Bedeutung bei der Regulation des Gefäßtonus über intrazelluläre Ca^{2+} -Signale und daher bei der Synthese vasoaktiv wirksamer Substanzen, könnte sie Zielmoleküle neuer Pharmaka darstellen. Generell gilt hierfür, dass kleine molekulare Öffner der TRP-Kanäle wegen ihrer möglichen antihypertensiven Wirksamkeit vielversprechender als Kanalblocker sind. Im Gegensatz zu den Kanalblockern wird angenommen, dass die pharmakologische Aktivierung von TRP-Kanälen über einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom die endotheliale Funktion über Förderung der Ca^{2+} -abhängigen Synthese endothelialer Vasodilatoren verbessert (Kohler et al. 2006).

Die funktionelle Korrelation von TRP-Kanälen mit Veränderungen des arteriellen Blutdruckes bei essentieller Hypertonie (Noorani et al. 2011) unterstreicht diese Kanäle als potenzielle Ziele von Pharmaka, welche Vasokonstriktion und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bei hypertensiven Erkrankungen vermindern, zusätzlich. Der Endothelin-1-Rezeptor-Antagonist Bosentan inhibiert das Endothelin-1- und PGF-vermittelte-Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen in Pulmonalarterien (PASMC); dies ist mit einer runterregulierten Expression des TRPC6-Kanals assoziiert (Kunichika et al. 2004).

Das geringe Wissen jedoch über die Funktion vieler TRP-Kanäle und der Mangel an selektiven Modulatoren behindert das Verständnis der mechanistischen Rolle von TRP-Kanälen bei Erkrankungen des Menschen und damit auch der Entwicklung neuer Pharmaka. Bis jetzt ist der am besten verstandene TRP-Kanal TRPV1. Für diesen existieren mehrere Antagonisten, die bei der Therapie verschiedener Schmerzformen angewandt werden. Ein weiteres Beispiel ist TRPC1, der in glatten Muskelzellen bei vaskulärer Verschlusskrankheit hochreguliert ist. Inhibitorische TRPC1-Antikörper haben das Potential, protektive Substanzen bei humanen Gefäßkrankheiten zu sein

(Nilius 2007). Auch von TRPC3 und TRPC5 ist bekannt, dass eine erhöhte Proteinexpression in Monozyten mit konsequenter Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms bei Patienten mit essentieller Hypertonie und hypertensiven Ratten assoziiert ist (Liu et al. 2006), (Liu et al. 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch nur die Expression von TRPC3 in HMEC-1 gezeigt werden.

Ebenso stellt TRPC6, aufgrund der Bedeutung für den Gefäßtonus und den peripheren Widerstand (Welsh et al. 2002), ein mögliches Zielmolekül künftiger pharmakologischer Forschung dar. Hier könnten Pharmaka zur Behandlung von Erkrankungen mit extensiver Vasokonstriktion entwickelt werden, wie Hypertonie oder Vasospasmus. Eine relativ neue Entdeckung ist, dass Carvacrol, ein Bestandteil von Oregano, durch Aktivierung von TRPV3-Kanälen in vaskulären Endothelzellen zerebrale Arterien relaxieren kann (Earley et al. 2010).

Die möglichen Pharmaka könnten dabei nicht nur Expression und Funktion der TRP-Kanäle inhibieren, sondern auch die funktionelle und physikalische Kopplung von TRP-Kanälen mit Membranrezeptoren und Membrantransportern, intrazellulären Organellen und IP_3 -Rezeptoren vermeiden, Caveolae zerstören und STIM/Orai-1 bzw. andere Messenger und Botenstoffe, die Ca^{2+} -Freisetzung vermittelten, runterregulieren (Firth et al. 2007). Jedoch werden viele dieser potentiellen Zielmoleküle nicht ausschließlich in Endothelzellen exprimiert. Des Weiteren ist die genaue physiologische Bedeutung der oben angeführten Zielmoleküle nicht ausreichend untersucht und verstanden. So gibt es für TRPV4 einen spezifischen und potenten Agonisten, GSK1016790A. Dieser stellt ein vielversprechendes Pharmakon bei kardiovaskulären Erkrankungen dar, da arterielle Antworten auf Shear Stress kritisch von der Aktivierung von endothelalem TRPV4 abhängen (Hartmannsgruber et al. 2007). GSK1016790A erhöht zwar, wie erwartet, die endotheliale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und führt zu endothel-abhängigen Relaxationen, andererseits kommt es aber auch zu endothelalem Versagen, Kreislaufversagen und Tod (Willette et al. 2008). Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass verbesserte pharmakologische Werkzeuge zunächst entwickelt werden müssten, um die physiologischen und pathophysiologischen Bedeutungen von TRP-Kanälen zu verstehen. Erst dann ist es möglich herauszufinden, ob möglicherweise selektive und potente Pharmaka mit wenig unerwünschten Wirkungen existieren, bzw. diese zu entwickeln (Feletou 2009).

Das Gebiet der Erforschung von TRP-Kanälen ändert sich so schnell und viele Hypothesen müssen noch untersucht werden. Mechanismen der Aktivierung und Regulation verschiedener TRP-Isoformen sind erst kürzlich erschlossen worden und werden in vielen Fällen noch kontrovers diskutiert. Direkte Verbindungen zwischen Aktivität endothelialer TRP-Kanäle und funktioneller Antwort des Gefäßes konnten bisher nur in wenigen Fällen überzeugend dargestellt werden. Daher ist die Aussage, dass endotheliale TRP-Kanäle eine signifikante Bedeutung bei der Kontrolle des Gefäßtonus haben, meist noch spekulativ (Yao und Garland 2005). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten bilden die Grundlage

Diskussion

für die zukünftige Forschung zu der physiologischen Relevanz der in HMEC-1 exprimierten TRP-Kanäle, der Festigung der Daten durch Verwendung weiterer Methodik und auch der Gewinnung von in situ Daten. Erst durch weitere Erkenntnisse besteht die Möglichkeit die Ergebnisse der Grundlagenforschung endothelialer TRP-Kanäle mittels pharmakologischer Maßnahmen in den klinischen Alltag einzubringen. Mit Hilfe neuer, spezifischer Pharmaka, welche Expression oder Öffnungswahrscheinlichkeit von TRP-Kanälen beeinflussen, könnten so Volkskrankheiten, wie Artherosklerose oder Hypertonie, besser therapiert werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ (1992). HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. J Invest Dermatol **99**(6): 683-90.
2. Ahmmed GU, Malik AB (2005). Functional role of TRPC channels in regulation of endothelial permeability. Eur J Physiol **451**: 131-142.
3. Antoniotti S, Lovisolo D, Pla AF, Munaron L (2002). Expression and functional role of bTRPC1 channels in native endothelial cells. FEBS Letters **510**: 189-195.
4. Arniges M, Fernandez-Ferna JM, Albrecht N, Schaefer M, Valverde MA (2005). Human TRPV4 Channel Splice Variants Revealed a Key Role of Ankyrin Domains in Multimerization and Trafficking. J. Biol Chem **281**(3): 1580-1586.
5. Bavencoffe A, Kondratskyi A, Gkika D, Shuba Y, Prevarskaya N, Skryma R (2011). Complex regulation of the TRPM8 cold receptor channel: role of arachidonic acid release following M3 muscarinic receptor stimulation. J Biol Chem **286**(11): 9849-55
6. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nature Reviews **4**: 517-529.
7. Birnbaumer L (2009). The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca²⁺ concentrations. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **49**: 395-426.
8. Boulanger CM (1999). Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. J Mol Cell Cardiol **31**: 39-49.
9. Brough GH, Wu S, Cioffi D, Moore TM, Li M, Dean N, Stevens T (2001). FASEB J **15**(10):1727-38.
10. Calahan MD (2001). Channels as enzymes. Nature **411**: 542-543.
11. Cantiello HF, Montalbetti N, Goldmann WH, Raychowdhury MK, González-Perrett S, Timpanaro GA, Chasan B (2005). Cation channel activity of mucolipin-1 – the effect of calcium. Eur J Physiol **451**: 304-312.
12. Cheng H-W, James AF, Foster RR, Hancox JC, Bates DO (2006). VEGF activates receptor-operated cation channels in human microvascular endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Bio **26**: 1768-1776.
13. Chi Ju-T, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS, Wang Z, Rockson SG, van de Rijn M, Botstein D, Brwon PO (2003). Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. PNAS **100**(19): 10623-10628.
14. Christensen AP, Corey DP (2007). TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? Nature Reviews **8**: 510-521.
15. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001). The TRP ion channel family. Nature Reviews **2**: 387-396.
16. Clapham DE (2003). TRP channels as cellular sensors. Nature **426**: 517-524.

17. Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. nomenclature and structure-function relationships of TRP channels. Pharmacol Rev **57**(4): 427-450.
18. Clapham DE (2007). Calcium signalling. Cell **131**: 1047-1058.
19. Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin S-Y, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung E L-M, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GSG, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasaukas D, Zhang D-S (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. Nature **432**: 723-730.
20. Cohen DM (2006). Regulation of TRP channels by N-linked glycosylation. Cell&Developmental Biol **17**: 630-637.
21. Cosens DJ, Manning A (1969). Abnormal electroretinogram for a Drosophila mutant. Nature **224** (5216): 285-287.
22. Delmas P (2004). Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. Cell **118**: 145-148
23. Devuyst O, Persu A, Vo-Cong M-T (2003). Autosomal dominant polycystic kidney disease: modifier genes and endothelial dysfunction. Nephrol Dial Transplant **18**: 2211-2215.
24. Dietrich A, Kalwa H, Fuchs B, Grimminger F, Weissmann N, Gudermann T (2007). In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. Cell Calcium **42**: 233-244.
25. Dietrich A, Kalwa H, Gudermann T (2010). TRPC channels in vascular cell function. Thromb Haemost. **103**: 262-270.
26. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. Cancer Res **58**(7):1515-20.
27. Earley S, Gonzales AL, Crnich R (2009). Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-activated K⁺ channels. Circ Res **104**: 00-00.
28. Earley S, Gonzales AL, Garcia ZI (2010). A dietary Agonist of Transient Receptor Potetinal Cation Channel V3 elicits endothelium-dependent Vasodilatation. Mol. Pharmacol **77**: 612-620.
29. Earley S, Bradyden JE (2010). Transient receptoe potential channels and vascular function. Clinical Science **119**, 19–36
30. Ecdet T, Schrer RW (2009). Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. Nat Rev Nephrol **5**: 221-228.
31. Erler I, H D, Wissenbach U, Flockerzi V, Niemeyer BA (2004). Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require specific ankyrin repeat. J Biol Chem **279**: 34456-34463.
32. Estacion M, Sinkins WG, Schilling WP (2001). Regulation of Drosophila transient receptor potential-like (TrpL) channels by Phospholipase C-dependent mechanisms. J Physiol **530.1**: 1-19.
33. Facemire CS, Mohler PJ, Arendshorst WJ (2004). Expression and relative abundance of short transient receptor potential channels in rat renal microcirculation. Am Physiol Renal Physiol **286**: F546-F551.
34. Feletou M, Vanhoutte PM (2006). Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(6): 1215-25.

35. Feletou M, Vanhoutte PM (2006). Endothelial Dysfunction: a multifaceted disorder. Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**: H985-H1002.
36. Feletou M (2009). Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? Brit J Pharmacol **156**: 545-562.
37. Firth AL, Remillard CV, Yuan JX-J (2007). TRP channels in hypertension. BBA **1772**: 895-906.
38. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. BioTechniques **26**(1): 112-22, 124-5
39. Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B (2001). Lack of endothelial store-operated current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. Nat Cell Biol **3**: 121-127.
40. Furchgott, R., J. V. Zawadzki (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature **288**(5789): 373-6
41. Gaudet R (2008). A primer on Ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. Mol Biosyst **4**: 372-379.
42. Gaudet R (2008). TRP channels entering the structural era. J Physiol **586**(15): 3565-3575.
43. Gerber H-P, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, and Ferrara N (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3*-kinase/Akt signal transduction pathway. J Biol Chem **273**(46): 30336-30343.
44. Griffin MD, Torres VE, Grande JP, Kumar R (1997). Vascular expression of polycystin. J Am Soc Nephrol **8**: 616-626.
45. Groschner K, Hingel S, Lintschinger B, Balzer M, Romanin C, Zhu X, Schreibmayer W (1998). Trp proteins form store-operated cation channels in human vascular endothelial cells. FEBS Lett **437**: 101-106.
46. Gudermann T, Flockerzi V (2005). TRP channels as new pharmacological targets. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol **371**: 241-244.
47. Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB (2002). The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. TRENDS in Pharmacol Sci **23**(4): 183-191.
48. Hardie RC, Minke B (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺-channel in Drosophila photoreceptors. Neuron **8**(4):643-51
49. Hardie RC (2001). Phototransduction in Drosophila melanogaster. J Exp Biol **204**: 3403-3409.
50. Hardie RC, Raghu P (2001). Visual transduction in Drosophila. Nature **413**: 186-193.
51. Hardie RC (2007). TRP channels and lipids: from Drosophila to mammalian physiology. J Physiol **578**.1: 9-24.
52. Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, Chen Z-P, Kemp BE, Venema RC (2001). Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. JBC **276** (19): 16587-16591.
53. Harteneck C, Plant TD, Schultz G (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. Trends Neurosci **23**: 159-166.

54. Harteneck C (2003). Proteins modulationg TRP channel function. Cell Calcium **33**: 303-310.
55. Hartmannsgruber V, Heyken WT, Kacik M, Kaistha A, Grgic I, Harteneck C et al. (2007). Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression. PLoS ONE **2**: e827.
56. He Y, Yao G, Savoia C, Touyz RM (2005). Transient receptor potential melastatin 7 ion channel regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensi II. Circ Res **96**: 207-215.
57. Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G, Schaefer M (2005). Homo- and heterometric assembly of TRPV channel subunits. J Cell Sci **118**(5): 917-928.
58. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. Nature **397**: 259-263.
59. Hoffman T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. Proc Natl Acad Sci USA **99**: 7461-7466.
60. Hoyer J et al. (1996). Up-regulation of pressure-activated Ca^{2+} -permeable cation channel in intact vascular endothelium of hypertensive rats. Proc Natl Acad Sci USA **93**: 11253-11258.
61. Hoyer J, Kohler R, Distler A (1997). Mechanosensitive cation channels in aortic endothelium of normotensive and hypertensive rats. Hypertension **30**: 112-119.
62. Ignarro, L., Byrns R, et al. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. Circ Res **61**(6): 866-879
63. Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y (2001). The transient receptor potential protein homologue TRPC6 is the essential component of vascular α_1 -adrenoreceptor-activated Ca^{2+} -permeabel cation channel. Circ Res. **88**(3):325-32.
64. Inoue K, Xiong Z-G (2009). Silencing TRPM7 promotes growth/proliferation and nitric oxide production of vascular endothelial cells via the ERK pathway. Cardiovasc Res. **83**(3):547-57.
65. Inoue R, Jian Z, Kawarabayashi (2009). Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. Pharmacology&Therapeutics. **123**(3):371-85.
66. Jaggar JH, Wellman GC, Heppner TJ, Porter VA, Perez GJ, Gollasch M, Kleppisch T, Rubart M, Stevenson AS, Lederer WJ, Knot HJ, Bonev AD, Nelson MT (1998). Ca^{2+} channels, ryanodine receptors and Ca^{2+} -activated K^+ channels: a functional unit for regulating arterial tone. Acta Physiol Scand **164**: 577-587.
67. Jelkmann W, Wagner K (2004). Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. Ann Hematol **83**: 673-686.
68. Johnson DC, Melanaphy D, Purse A, Stokesberry SA, Dickson P, Zholos AV (2009). Transient receptor potential Melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. Am J Physiol Heart Circ Physiol. **296**(6): H1868-77.
69. Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Jannssens A, Kwan KY, Veenekens R, Nilius B, Voets T (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vivo and in vitro. PNAS **106**: 1273-1278.
70. Kim K, Drummond I, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Klinger K, Arnaout MA (2000). Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. Proc Nat Acad Sci USA **97**: 1731-1736.
71. Kiselyov K, Soyombo A, Muallem S (2007). TRPpathies. J Physiol **578**(3): 641-653.

72. Kohler et al. (2000). Expression and function of endothelial Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human mesenteric artery: a single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. Circ Res **87**: 496-503.
73. Kohler R, Brakemeier S, Kuhn M, Degenhardt C, Buhr H, Pries A, Hoyer J (2001). Expression of ryanodine receptor type 3 and TRP channels in endothelial cells: comparison of in situ and cultured human endothelial cells. Cardiovasc Res **51**: 160-168.
74. Kohler R, Heyken WT, Heinau P, Schubert R, Si H, Kacik M, Busch C, Grgic I, Maier T, Hoyer J (2006) Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. Arterioscler Throm Vasc Biol **26**: 1495-1502.
75. Kohler R, H.J. (2007) Role of TRPV4 in the Mechanotransduction of Shear Stress in Endothelial Cells, in TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades, W. Liedtke, Heller, S., Editor. 2007, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 377-388.
76. Kraft R, Harteneck C (2005). The mammalian melastatin-related transient receptor cation channels: an overview. Pflügers Arch **451**: 204-211.
77. Kunert-Keil C, Bisping F, Krüger J, Brinkmeier H (2006). Tissue-specific expression of TRP channel genes in mouse and its variation in three different mouse strains. BMC Genomics **7**: 159.
78. Kunichika N, Landsberg JW, Yu Y, Kunichika H, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX (2004). Bosentan inhibits transient receptor potential channel expression in pulmonary vascular myocytes. Am J Respir Crit Care Med **170**(10): 1101-7.
79. Kwan HY, Huang Y, Yao X (2007). TRP channels in endothelial function and dysfunction. BBA **1772**: 907-914.
80. Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vergas G (2007). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. Cell Calcium **42**: 427-438.
81. Langeslag M, Clark K, Moolenaar WH, van Leeuwen FN, Jalink K (2007). Activation of TRPM7 channels by phospholipase C-coupled receptor agonists. J Biol Chem **282**(1): 232-239.
82. Lepage PK, Lussier MP, Barajas-Martinez H, Bousquet SM, Blanchard AP, Francoeur N, Dumaine R, Boulay G (2006). Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels. J Biol Chem **281**(41): 30356-30364.
83. Levitan IB, Cibulsky SM (2001). TRP ion channels – two proteins in one. Science **293**: 1270-1.
84. Li J-M, Shah AM (2004). Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**: R1014-R1030.
85. Liu D, Scholze A, Zhu Z, Krueger K, Thilo F, Burkert A, Steffer K, Holz S, Harteneck C, Zidek W, Tepel M (2006). Transient receptor potential channels in essential hypertension. Journal of Hypertension **24**(6): 1105-1114.
86. Liu D, Scholze A, Zhu Z, Holz S, Steffer K, Zidek W, Tepel M (2006). Increased transient receptor potential (TRP) channel expression and cation influx in essential hypertension. Am J Hypertens **24**: 1115-1124.
87. Liu D, Scholze A, Zhu Z, Krueger K, Thilo F, Burkert A, Steffer K, Holz S, Harteneck C, Zidek W, Tepel M (2006). Transient receptor potential channels in essential hypertension. J Hypertens **24**: 1105-1114.

88. Liu D, Yang D, He H, Chen X, Cao T, Feng X, Ma L, Luo Z, Wang L, Yan Z, Tepel M (2009). Increased transient receptor potential canonical type 3 channels in vasculature from hypertensive rats. Hypertension **53**: 70-76.
89. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods **25**(4):402-8
90. Luckhoff A, Pohl U, Mulsch A, Busse R (1988). Differential role of intra- and extracellular calcium in the release of EDRF and Prostazyklin from cultured endothelial cells. Br J Pharmacol **95**: 189-196.
91. Matsumoto T, Mugishima H (2006). Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in angiogenesis. J Atheroscler Thromb **13**(3): 130-135.
92. Mazzuca MQ, Khalil RA (2012). Vascular Endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. Biochem Pharmacol **84**(2): 147-62.
93. McLaughlin AP, de Vries GW (2001). Role of PLC γ and Ca²⁺ in VEGF- and FGF-induced choroidal endothelial cell proliferation. Am J Physiol Cell Physiol **281**: C1448-C1456.
94. Minke B (2006). TRP channels and Ca²⁺ signalling. Cell Calcium **40**: 261-275.
95. Michiel C (2003). Endothelial cell function. J Cell Physiol **196**: 430-443.
96. Montell C, Rubin GM (1989). Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. Neuron **2**: 1313-1323.
97. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. Mol Cell **9**: 229-231.
98. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. Cell **108**: 595-598.
99. Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng Z-Y (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. Protein Sci **13**: 1435-1448.
100. Munaron L, Fiorio Pla A (2000). Calcium influx induced by activation of tyrosine kinase receptors in cultured bovine aortic endothelial cells. J Cell Physiol: **185**(3):454-63.
101. Nadler MJS, Hermosura MC, Inabe K, Perraus AL, Zhu Q, Stokes A, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A (2001). LTRPC7 is a Mg-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. Nature **411**: 590-595.
102. Nijenhuis T, Sloan AJ, Hoederop JG, Flesche J, van Goor H, Kistler AD, Bakker M, Bindels RJ, de Boer RA, Möller CC, Hamming I, Navis G, Wetzels JF, Berden JH, Reiser J, van der Vlag J (2011). Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRP6 expression via an NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. Am J Pathol. **179**(4): 1719-32.
103. Nilius B, Schwartz G, Oike M, Droogmans G (1993). Histamine-activated, non-selective cation currents and Ca²⁺ transients in endothelial cells from human umbilical vein. Pflugers Arch. **424**(3-4):285-93.
104. Nilius B, Droogmans G (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. Physiol Rev **81**: 1415-1459.

105. Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2005). Gating of TRP channels: a voltage connection? J Physiol **567.1**: 35-44.
106. Nilius B, Voets T (2005). TRP channels: a TRP(IP) through a world of multifunctional cation channels. Eur J Physiol **451**: 1-10.
107. Nilius B, Mahieu F, Prenen J, Janssens A, G. Owsianik, Vennekens R, Voets T (2006). The Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat. The EMBO Journal **25**: 667-478.
108. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007). Transient receptor cation channels in disease. Physiol Rev **87**:165-217.
109. Nilius B (2007). TRP Channels in disease. BBA **1772**: 805-812.
110. Nilius B, Voets T (2007). Channelling cold reception. Nature **448**: 147-148.
111. Nilius B, Owsianik G, Voets T (2008). Transient receptor potential channels meet phosphoinositides. The EBO Journal **27**: 2809-2816.
112. Nilius B, Voets T (2008). A TRP channel-steroid marriage. Nature Cell Biol **10**: 1383-1384.
113. Noorani MM, Noel RC, Marrelli SP (2011). Upregulated TRPC3 and downregulated TRPC1 channel expression during hypertension is associated with increased vascular contractility in rat. Front Physiol. 2:42:1-9.
114. Paria BC, Vogel SM, Ahmmed GU, Alamgir S, Schroff J, Malik AB, Tiruppathi C (2004). Tumor necrosis factor- α -induced TRPC1 expression amplifies store-operated Ca^{2+} influx and endothelial permeability. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**: 1303-1313.
115. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005). TRP channels: an overview. Cell Calcium **38**: 233-252.
116. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve JA, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2000). A TRP Channel that senses cold stimuli and menthol. Cell **108**: 705-715.
117. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner, R, Kinet JP, Scharenberg AM (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. Nature **411**: 595-599.
118. Petersen CCH, Berridge MJ, Borgese MF, Bennett DL (1995). Putative capacitative calcium entry channels: expression of Drosophila trp and evidence for the existence of vertebrate homologues. Biochem J **311**: 41-44.
119. Putney JW (1990). Receptor-regulated calcium entry. Pharmac Ther **48**: 427-434.
120. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006). An introduction to TRP channels. Annu Rev Physiol **68**: 619-647.
121. Salido GM, Sage SO, Rosado JA. Biochemical and functional properties of the store operated Ca^{2+} channels. Cell Signal **21**(4):457-61.
122. Sane DC, Anton L, Brosnihan KB (2004). Angiogenic growth factors and hypertension. Angiogenesis **7**: 193-201.
123. Schiffrin EL (2005). Role of endothelin-1 in hypertension. Hypertension **22**(6):1141-9.
124. Schindl R, Romanin C (2007). Assembly domains in TRP channels. Biochem Soc Trans **35**(Pt 1):84-5.

125. Schmitz C, Perraud A-L, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurotaki T, Fleig A, Scharenberg AM (2003). Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7. Cell **114**: 191-200.
126. Sherkheli MA, Vogt-Eisele AK, Bura D, Beltran Marques LR, Gisselmann G, Hatt H (2010). Characterization of selective TRPM8 ligands and their structure activity response (S.A.R.). J Pharm Pharmaceut Sci **13**(2): 242-253.
127. Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A (1996). The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. J Cardiovasc Pharmacol **28**: 703-711.
128. Shimokawa H (1999). Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. J Mol Cell Cardiol **31**: 23-37.
129. Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. Neuron **29**: 645-655.
130. Tan X, Essengue S, Talreja J, Reese J, Stechschulte DJ, Dileepan KN (2007). Histamine directly and synergistically with lipopolysaccharide stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I₂ and E₂ production in human coronary artery endothelial cells. J Immun **179**: 7899-7906.
131. Thilo F, Baumunk D, Krause H, Schrader M, Miller K, Loddenkemper C, Zakrzewicz A, Krueger K, Zidek W, Tepel M (2009). Transient receptor potential canonical type 3 channels and blood pressure in humans. J Hypertens **27**(6): 1217-1223.
132. Tiruppathi C, Freichel M, Vogel SM, Paria BC, Mehta D, Flockerzi V, Malik AB (2002). Impairment of store-operated Ca^{2+} entry in TRPC4^(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. Circ Res **91**: 70-76.
133. Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB (2003). Role of Ca^{2+} signaling in the regulation of endothelial permeability. Vascular Pharmacology **39**: 173-185.
134. Torres VE, Cai Y, Chen X, Wu GQ, Geng L, Cleghorn KA, Johnson CM, Somlo S (2001). Vascular expression of polycystin-2. J Am Soc Nephrol **12**: 1-9.
135. Touyz RM, He Y, Montezano ACI, Yao G, Chubonov V, Gudermann T, Callera GE (2006). Differential regulation of transient receptor potential melastatin 6 and 7 cation channels by ANG II in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol **290**: R73-R78.
136. Touyz RM (2008). Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels, magnesium transport, and vascular biology: implications in hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**: H1103-H1118.
137. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A (1997). Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. J Clin Invest **100**: 2793-2799.
138. Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L (1998). The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and Epitope immunohistochemistry. J Biol Chem **273**: 8675-8679.
139. Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L (1999). Mouse trp2, the homologue of the human pseudogene, encodes mTRP2, a store depletion-activated capacitative Ca^{2+} entry channel. Proc Natl Acad Sci USA **96**: 2060-2064.

140. Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL (2003). Regulation of canonical transient receptor potential (TRP) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. J Biol Chem **278**: 29031-29040.
141. Venkatachalam K, Montell C (2007). TRP channels. Annu Rev Biochem **76**: 387-417.
142. Vennekens R, Voets T, Bindels RJM, Droogmans G, Nilius B (2002). Current understanding of mammalian TRP homologues. Cell Calcium **31**(6): 253-264.
143. Voets T, Nilius B (2003). TRPs make sense. J Membrane Biol **192**: 1-8.
144. Voets T, Janssens A, Droogmans G, Nilius B (2004). Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel. J Biol Chem **279**(15): 15223-15230.
145. Voets T, Droogmans G, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. Nature **430**: 748-754.
146. Voets T, Nilius B (2009). TRPCs, GPCRs and the Bayliss effect. The EMBO J **28**(1): 4-5.
147. Vriens J, Appendino G, Nilius B (2009). Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. Mol Pharmacol **75**(9): 1262-1279.
148. Wang D, Iversen J, Strandgaard S (2000). Endothelium-dependent relaxation of small resistance vessels is impaired in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. J Am Soc Nephrol **11**: 1371-1376.
149. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H (2008). TRP channel and cardiovascular disease. Pharmacology&Therapeutics **118**: 337-351.
150. Welsh DG, Morielli AS, Nelson MT, Brayden JE (2002). Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. Circ Res **90**: 248-250.
151. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995). TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. Cell Biol **92**: 9652-9656.
152. Willette RN, Bao W, Nerurkar S, Yue TL, Doe CP, Stankus G et al. (2008). Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: Part 2. J Pharmacol Exp Ther **326**: 443-452.
153. Wissenbach U, Nilius B, Flockerzi V (2004). TRP channels as potential drug targets. Biol Cell **96**: 47-54.
154. Wong CO, Yao X (2011). TRP channels in vascular endothelial cells. Adv Exp Med Biol **704**: 759-80.
155. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi, Mitsui Y, Yazaki Ym Goto K, Masaki T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature **332**: 411-415.
156. Yao X, Garland CJ (2005). Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. Circ Res **97**: 853-863.
157. Yip H, Chan W-Y, Leung P-C, Kwan H-Y, Liu C, Huang Y, Michel V, Ywe DT-W, Yao X (2004). Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries. Histochem Cell Biol **122**:553-561
158. Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K et al. (2000). Expression of von Willebrand factor, an endothelial marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. Int J Cancer **85**: 281-288.

159. Zhu MZ, Bradbury DA, Pang L, Knox AJ (2003). Transcriptional regulation of interleucin (IL)-8 by bradykinin in human airway smooth muschle cells involves prostanoid-dependent activation of AP-1 and nuclear factor (NF)-IL-6 and prostanoid-independenr activation of NF- κ B. JBC **278**(31): 29366-29375.
160. Zhu MX (2005). Multiple roles of calmodulin and other Ca^{2+} binding proteins in the functional regulation of TRP channels. Pflügers Arc Europ J Physiol, Special issue, Functional role of TRP channels, edited by Nilius B.

Onlinequellen:

Asuragen : <http://www.asuragen.com/images/TaqMan%20GX%20cartoon.jpg>

Bradykinin : <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/kegg/kegg/db/ligand/gif/C00306.gif>

Endothelin-1 : <http://www.chemicalbook.com/CAS%5CGIF%5C117399-94-7.gif>

Erythropoietin : www.curaxys.com/erythropoietin.htm

Histamin : <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/kegg/kegg/db/ligand/gif/C00388.gif>

RT-PCR : Asuragen: <http://www.asuragen.com/images/TaqMan%20GX%20cartoon.jpg>

VEGF : www.rcsb.org/pdb

7. Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Basler	Schnabel
Baum	Schneider
Daut	Schrader
Dettmeyer	Sundermeyer
Feuser	Tibesku
Gudermann	Vogelmaier
Gress	Wagner
Grzeschik	Weihe
Herrmann-Lingen	Werner
Hertel	Wulf
Hilt	
Hoyer	
Junclass	
Kann	
Koolman	
Klose	
Krieg	
Kroll	
Lenz	
Lill	
Lohoff	
Maier	
Maisch	
Martin	
Moll	
Moosdorf	
Mueller	
Neubauer	
Oertel	
Renz	
Richter	
Rothmund	
Schäfer	
Schmidt	

8. Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank und Respekt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Joachim Hoyer für die großzügige Bereitstellung von Labor und Forschungsmaterialien in seiner Abteilung bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Doktorvätern Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ralf Kohler und Herrn Prof. Dr. med. Joachim Hoyer für die Überlassung dieses interessanten und spannenden Themas. Weiterhin möchte ich mich bei ihnen für das ständige Interesse und Engagement am Fortgang dieser Arbeit, die freundliche Aufnahme in das Labor und beim Erstellen dieser Arbeit sowie bei der Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Herrn Dr. rer. nat. Willm-Thomas Heyken, Herrn Brajesh Kaistha, PhD, und Frau Annuradha Kaistha, PhD, danke ich für Einführung in laborexperimentelle Techniken, das Beantworten zahlloser Fragen sowie für die gute Zusammenarbeit.

Allen anderen Mitarbeitern und Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe möchte ich für die sehr kollegiale, freundschaftliche und motivierende Zusammenarbeit im Labor danken. Dabei zu nennen sind insbesondere Frau Kirsten Plefka, Frau Dr. med. Veronika Hartmannsgruber sowie Herrn Dr. med. Sebastian Brähler.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern. Ihnen habe ich meine schulische und universitäre Ausbildung zu verdanken. Danke auch an meine Geschwister Vera und Simon sowie an meine lieben Freunde für den großen Rückhalt und die Unterstützung in allen Lebenslagen.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Expression und Modulation endothelialer TRP-Kanäle in humanen Endothelzellen“ im Institut für Innere Medizin/Nephrologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Hoyer, Herrn PD Dr. R. Köhler mit Unterstützung durch Herrn Dr. Willm-Thomas Heyken ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Offenbach, 07.01.2013

Unterschrift